

WALIKOTA SURABAYA
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN INOVASI

KELUWIH
**JURNAL SAINS
DAN TEKNOLOGI**



Nasional Journal of Science and Technology
Keluwih
Jurnal Sains dan Teknologi
Volume 10 Nomor 1
2022



[Home](#) / [Archives](#) / **Vol. 1 No. 1 (2020): Keluwih: Jurnal Sains dan Teknologi (February)**

Vol. 1 No. 1 (2020): Keluwih: Jurnal Sains dan Teknologi (February)



DOI: <https://doi.org/10.24123/saintek.v1i1>

Published: 2020-02-28

[Links](#)

- [Editorial Team](#)
- [Reviewer List](#)
- [Focus & Scope](#)
- [Duties of Authors](#)
- [Duties of Reviewers](#)
- [Publication Ethics](#)
- [Authors Guidelines](#)
- [Reviewers Guidelines](#)
- [Statement of Originality](#)
- [Visitor Statistics](#)
- [Open Access Policy](#)
- [Screening for Plagiarism](#)
- [Author Fees](#)

Deteksi *Vibrio harveyi* dengan Metode Amplifikasi DNA pada Gen *toxR*

Calvin Wijaya Johan

Jurusan Biologi, Fakultas Teknobiologi, Universitas Surabaya

Sulistyo Emantoko Dwi Putra

Jurusan Biologi, Fakultas Teknobiologi, Universitas Surabaya

Ernest Suryadjaja

Jurusan Biologi, Fakultas Teknobiologi, Universitas Surabaya

DOI: <https://doi.org/10.24123/saintek.v1i1.2775>

Abstract Views: 264 PDF Downloads: 149

Keywords: Akuakultur, LAMP, PCR, *toxR*, *Vibrio harveyi*, Aquaculture




[Home](#) / [Editorial Team](#)

Editorial Team

Editor in-Chief:

Markus Hartono, Faculty of Engineering, University of Surabaya [[Google Scholar](#)] [[Scopus](#)]

Assistant Editor:

Thomas S. Iswahyudi, Directorate of Publishing and Academic Publication, University of Surabaya

Managing Editor:

Singgih Sugiarto, Directorate of Publishing and Academic Publication, University of Surabaya

Section Editor:

Johan Sukweenadhi, Faculty of Technology, University of Surabaya [[Google Scholar](#)] [[Scopus](#)]

Theresia Desy Askitosari, Faculty of Technology, University of Surabaya [[Google Scholar](#)] [[Scopus](#)]

Wyna Herdiana, Faculty of Creative Industry, University of Surabaya [[Google Scholar](#)] [[Scopus](#)]

Delta Ardy Prima, Faculty of Engineering, University of Surabaya [[Google Scholar](#)] [[Scopus](#)]

Reviewer:

Markus Hartono, Faculty of Engineering, University of Surabaya [[Google Scholar](#)] [[Scopus](#)]

Hazrui Iswadi, Faculty of Engineering, University of Surabaya [[Google Scholar](#)] [[Scopus](#)]

Tuani Lidiawati Simangunsong, Faculty of Engineering, University of Surabaya [[Google Scholar](#)] [[Scopus](#)]

Rafina Destiarti Ainul, Faculty of Engineering, University of Surabaya [[Google Scholar](#)] [[Scopus](#)]

Mariana Wahjudi, Faculty of Technology, University of Surabaya [[Google Scholar](#)] [[Scopus](#)]

Tjie Kok, Faculty of Technology, University of Surabaya [[Google Scholar](#)] [[Scopus](#)]

Sulistyo Emantoko Dwi Putra, Faculty of Technology, University of Surabaya [[Google Scholar](#)] [[Scopus](#)]

Devi Fitriah, Faculty of Computer Science, Universitas Mercu Buana, Jakarta [[Google Scholar](#)] [[Scopus](#)]

Ramadhani Eka Putra, School of Life Sciences & Technology, Institut Teknologi Bandung [[Google Scholar](#)] [[Scopus](#)]

Journal Manager: Miftahur Rahman Fibri

Designer: Indah Setyo Rahayu

Administrative Staff: Haniatun Nadjichah

Links

[Editorial Team](#)
[Reviewer List](#)
[Focus & Scope](#)
[Duties of Authors](#)
[Duties of Reviewers](#)
[Publication Ethics](#)
[Authors Guidelines](#)
[Reviewers Guidelines](#)
[Statement of Originality](#)
[Visitor Statistics](#)
[Open Access Policy](#)
[Screening for Plagiarism](#)
[Author Fees](#)
[Copyright Notice](#)
[Abstracting and Indexing](#)

Download:

[Tutorial Submit](#)

[Article Template](#)

Tools

[Digital Object Identifier](#)

[Mendeley](#)

[turnitin](#)

Visitor



Further Information:

Direktorat Penerbitan dan Publikasi Ilmiah
 Universitas Surabaya
 Jl. Raya Kalirungkut - Surabaya 60293
 Gedung Perpustakaan Lt. 4
 Telp. 031-2981344
 E-mail: ppi@unit.ubaya.ac.id
 Laman: <http://ppi.ubaya.ac.id>

eISSN 2721-2432 [[LPII](#)] [[PORTAL.ISSN](#)]



This journal is published under the terms of the is licensed under a
[Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International License](#)

Pengaruh Pengolahan Terhadap Nilai Fungsional Bawang Putih (*Allium sativum*)

Chessa Uly Thalia, Ruth Chrisnasari, Ardhia Dheasy Rosita Dewi

1-14


 Abstract Views: 485  PDF Downloads: 331  DOI <https://doi.org/10.24123/saintek.v1i1.2782>

 PDF

Kefir Susu Nabati dengan Penambahan Kulit Pisang Tanduk (*Musa Paradisiacal* Var. *Corniculata*)

Vina Priscilla, Tjandra Pantjajani, Fenny Irawati

15-28




 Abstract Views: 315  PDF Downloads: 230  DOI <https://doi.org/10.24123/saintek.v1i1.2780>

 PDF

Deteksi *Vibrio harveyi* dengan Metode Amplifikasi DNA pada Gen *toxR*

Calvin Wijaya Johan, Sulistyo Emantoko Dwi Putra, Ernest Suryadjaja

29-37

 Abstract Views: 264  PDF Downloads: 149  DOI <https://doi.org/10.24123/saintek.v1i1.2775>

 PDF

Karakterisasi Enzim Pemecah Pati dari Malt Serelia

Alvina Cornelia Phieter, Ruth Chrisnasari, Tjandra Pantjajani

38-48

 Abstract Views: 757  PDF Downloads: 627  DOI <https://doi.org/10.24123/saintek.v1i1.2773>

 PDF

Kajian Semiotika Pernikahan Karakter Virtual Hatsune Miku dan Akihiko Kondo

Guguh Sujatmiko

49-55

 Abstract Views: 153  PDF Downloads: 77  DOI <https://doi.org/10.24123/saintek.v1i1.2787>

 PDF

Kajian Tentang Tenun Seseq dari Desa Pringgasela, Lombok Timur, Nusa Tenggara Barat

Ninik Juniati

58-62

 Abstract Views: 210  PDF Downloads: 134  DOI <https://doi.org/10.24123/saintek.v1i1.2788>

 PDF

Kansei Mining-based in Services sebagai Alternatif Pengembangan Metodologi Affective Design

Markus Hartono

63-68

 Abstract Views: 129  PDF Downloads: 80  DOI <https://doi.org/10.24123/saintek.v1i1.2817>

 PDF

Original Research

Deteksi *Vibrio Harveyi* Dengan Metode Amplifikasi DNA pada Gen *toxR*

Calvin Wijaya Johan ^{1*}, Sulistyو Emantoko Dwi Putra ¹, Ernest Suryadjaja ¹

¹ Fakultas Teknobiologi, Universitas Surabaya, Raya Kalirungkut Surabaya-Indonesia 60293

*corresponding author: calvin_wijaya_johan@yahoo.com

Abstract-*Vibrio harveyi* infection in aquacultures may cause death and economical loss. Rapid detection of this bacteria may prevent its dispersal in aquacultures. The goal of this research was to develop method in detection of *Vibrio harveyi* via amplification of *toxR* gene. DNA amplification was carried out with two methods, loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and polymerase chain reaction (PCR). Amplification with LAMP suggest optimization of either protocol or primer design was needed to prevents false positive results. Amplification with PCR yields 229 bp-length product specific to *Vibrio harveyi* with detection limit up to 0.526 ng.μL⁻¹ (equals to 2.09 × 10⁶ CFU.mL⁻¹).

Keywords: Aquaculture, LAMP, PCR, *toxR*, *Vibrio harveyi*

Abstrak-Infeksi hewan akuakultur oleh *Vibrio harveyi* dapat menyebabkan kematian serta kerugian ekonomi. Kemampuan untuk mendeteksi bakteri tersebut secara dini dapat mencegah penyebarannya dalam akuakultur. Penelitian ini bertujuan mengembangkan metode untuk mendeteksi *Vibrio harveyi* melalui amplifikasi gen *toxR*. Amplifikasi DNA dilakukan dengan dua metode, yakni amplifikasi isothermal termediasi *loop* (*loop-mediated isothermal amplification*, LAMP) dan reaksi berantai polimerase (PCR). Amplifikasi menggunakan metode LAMP menunjukkan perlu dilakukan optimasi protokol maupun desain primer untuk mencegah perolehan hasil *false positive*. Amplifikasi menggunakan metode PCR menghasilkan produk berukuran 229 pasang basa yang spesifik pada *Vibrio harveyi* dengan batas deteksi hingga 0,526 ng.μL⁻¹ (setara 2,09 × 10⁶ CFU.mL⁻¹).

Kata kunci: Akuakultur, LAMP, PCR, *toxR*, *Vibrio harveyi*

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara kepulauan terbesar di dunia dengan potensi budidaya udang yang cukup besar. Hal ini terlihat dari kemampuan Indonesia dalam menghasilkan 400 kg udang untuk setiap hektar pertambakan udang tiap tahunnya (Garno, 2004). Udang yang menjadi komoditas unggulan Indonesia ada dua, yakni udang Windu (*Penaeus monodon*) dan udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*). Pada tahun 2013 sebanyak 25,4% udang yang dihasilkan diekspor oleh Indonesia ke negara lainnya (Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya, n.d.). Oleh karena itu produksi udang di Indonesia perlu dihindarkan dari faktor-faktor penyebab kegagalan panen, misalnya terserang penyakit.

Vibrio harveyi adalah bakteri Gram negatif yang dapat berluminesens dan merupakan patogen bagi udang yang banyak dijumpai di perairan laut (Austin & Zhang, 2006). Bakteri ini dapat dijumpai di perairan Indonesia dan dapat menginfeksi udang Windu maupun udang Vaname (Felix, Nugroho, Silalahi, & Octavia, 2011; Robertson *et al.*, 1998; Liu, Lee, & Chen, 1996). Infeksi oleh *Vibrio harveyi* dapat menyebabkan berbagai gejala seperti lesu, tidak nafsu makan, kerusakan organ dan dapat berakibat pada kematian (Austin, 2010). Oleh karena itu, untuk mencegah penyebaran bakteri tersebut ke dalam akuakultur diperlukan metode untuk mendeteksi keberadaan bakteri tersebut.

Deteksi *Vibrio harveyi* dapat dilakukan dengan metode konvensional maupun metode molekuler. Metode molekuler seperti amplifikasi DNA umumnya lebih sering digunakan karena dapat digunakan untuk mendeteksi lebih cepat (Hundenborn, Thurig, Kommerell, Haag, & Nolte, 2013). Metode amplifikasi DNA yang paling banyak digunakan adalah menggunakan PCR. PCR telah digunakan untuk mendeteksi *Vibrio harveyi* dengan berbagai gen sasaran,

misalnya 16S rDNA maupun gen *toxR* (Pang *et al.*, 2006; Oakey, Levy, Bourne, Cullen & Thomas, 2003). Akan tetapi, metode PCR dalam penelitian sebelumnya memiliki kelemahan baik dalam spesifisitas maupun waktu deteksi.

Metode lainnya yang dapat digunakan untuk amplifikasi DNA adalah LAMP. Metode ini menggunakan 2 pasang primer untuk mengenali 6 daerah pada DNA cetakan sehingga memiliki spesifisitas yang lebih baik. LAMP juga menggunakan enzim *Bst* polimerase yang memiliki aktivitas *strand-displacement* untuk melakukan amplifikasi pada satu suhu dengan lama reaksi hanya satu jam (Notomi *et al.*, 2000). Kecepatan reaksi dapat dipercepat dengan menggunakan primer *loop* dan primer *stem* (Gandelman, Jackson, Kiddle, & Tisi, 2011; Nagamine, Hase, & Notomi, 2002).

Deteksi *Vibrio harveyi* dengan LAMP telah dilakukan, namun tidak menggunakan primer *stem* ataupun primer *loop* untuk mempercepat reaksi (Cao, Wu, Jian, & Lu, 2010). Penelitian ini membuat desain primer LAMP baru untuk mendeteksi *Vibrio harveyi* yang menyediakan tempat untuk penempelan primer *stem* dan primer *loop*. Desain primer yang dihasilkan kemudian diuji apakah dapat digunakan untuk deteksi dengan metode LAMP. Di samping itu, primer luar digunakan untuk deteksi dengan metode PCR.

METODE PENELITIAN

Biakan dan Kultivasi Bakteri

Biakan *Vibrio harveyi* yang diperoleh dari Balai Pengembangan Perikanan dan Budidaya Air Payau dibiakan di medium *tryptic soy agar* atau *tryptic soy broth* yang diperkaya dengan NaCl 2,5% pada suhu 28°C. Biakan *Vibrio cholerae* dan *Escherichia coli* diperoleh dari Laboratorium Bioteknologi Mikroorganisme Fakultas Teknobiologi Universitas Surabaya. *Vibrio cholerae* dan *Escherichia coli* dibiakan di medium *tryptic soy agar* atau *tryptic soy broth* yang diperkaya dengan NaCl 2,5% pada suhu 37°C.

Isolasi DNA Bakteri

Isolasi DNA dilakukan dengan dua metode, yakni *thermal lysis* dan Chen & Kuo (1993). Metode *thermal lysis* dilakukan dengan mengendapkan 1,5 mL biakan bakteri dengan sentrifugasi pada 12.000 rpm selama 3 menit. Pelet diresuspensi menggunakan 50 µL ddH₂O kemudian dididihkan selama 5 menit. Debris sel kemudian diendapkan dengan sentrifugasi pada 12.000 rpm selama 3 menit. Supernatan kemudian diambil dan digunakan sebagai cetakan untuk reaksi amplifikasi.

Metode Chen dan Kuo dilakukan dengan mengendapkan 1,5 mL biakan bakteri dengan sentrifugasi pada 12.000 rpm selama 3 menit. Pelet diresuspensi dengan 200µL *lysis buffer* (Tris-asetat 40 mM pH 8,0, Na-asetat 20 mM, 1 mM EDTA, SDS 1%) kemudian ditambahkan 66 µL NaCl 5 M dan diendapkan dengan sentrifugasi pada 12.000 rpm selama 10 menit pada 4°C. Supernatan diambil dan ditambahkan klorofom dengan volume yang sama kemudian dibolak-balik hingga terbentuk campuran berwarna putih susu. Campuran kemudian disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 3 menit kemudian fase air diambil dan dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi baru. Etanol absolut dingin dengan volume 2 kali volume fase air yang terambil ditambahkan dan dibolak balik hingga homogen. Campuran didiamkan selama 2-4 jam di dalam bak es sebelum disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 3 menit pada suhu 4°C. Pelet yang terbentuk kemudian dicuci dengan etanol 70% sebanyak 2 kali sebelum dilarutkan dengan 50 µL ddH₂O.

Desain Primer dan Uji Penempelan Primer

Primer LAMP didesain menggunakan piranti lunak PrimerExplorer V5 (<http://primerexplorer.jp/lampv5e/index.html>) sesuai dengan panduan "A Guide to LAMP primer designing" (http://primerexplorer.jp/e/v4_manual/index.html). Sekuens *Vibrio harveyi* yang digunakan merupakan sekuens gen *toxR* yang terkonservasi pada beberapa galur *Vibrio harveyi*

(DQ503438.1, DQ640261.1, DQ640260.1, DQ640259.1, DQ640258.1, DQ640255.1, DQ517446.1 dan DQ403146.1) yang diperoleh dari pangkalan data GenBank.

Penempelan primer *outer* (F3 & B3) diuji menggunakan reaksi PCR. Reaksi PCR dilakukan pada campuran reaksi 10 μ L yang mengandung GoTaq[®] Green Master Mix 1 \times (Promega), primer F3 dan B3 masing-masing 1 μ M dan 1 μ L DNA cetakan dengan produk amplifikasi yang diharapkan berukuran 229 bp. Hasil PCR kemudian diencerkan 50 kali dan digunakan sebagai cetakan dalam reaksi *nested*- PCR untuk menguji kemampuan penempelan primer *inner* (FIP & BIP). *Nested*- PCR dilakukan pada campuran reaksi 10 μ L yang mengandung GoTaq[®] Green Master Mix 1 \times (Promega), primer FIP dan BIP masing-masing 1,6 μ M dan 1 μ L DNA cetakan dengan produk amplifikasi yang diharapkan berukuran 222 bp. Kedua reaksi PCR dilakukan dengan predenaturasi pada 95 $^{\circ}$ C selama 5 menit, 30 siklus yang tersusun atas denaturasi pada 95 $^{\circ}$ C selama 1 menit, penempelan primer pada 53 $^{\circ}$ C selama 1 menit dan elongasi pada 72 $^{\circ}$ C selama 30 detik.

LAMP

Reaksi LAMP dilakukan pada volume reaksi 10 μ L dengan campuran reaksi dasar Tris-Cl pH 8,8 20 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, KCl 50 mM, Tween[®] 0,1%, dNTP 1,4 mM, *Bst* 2.0 WarmStart[®] DNA Polymerase 8 U dan 0,4 μ L DNA cetakan. Suhu optimum reaksi ditentukan melalui variasi suhu reaksi 55, 57, 59, 61, 63 dan 65 $^{\circ}$ C selama 1 jam diikuti dengan pemanasan pada 85 $^{\circ}$ C selama 3 menit. Kadar MgSO₄ juga divariasikan pada 2-8 mM sementara kadar DMSO yang ditambahkan divariasikan pada 2,5-10%. Waktu reaksi juga divariasikan pada 35, 40 dan 45 menit. Hasil reaksi divisualisasi dengan elektroforesis gel agarosa 1,5 %. Hasil positif ditunjukkan dengan keberadaan larik serupa tangga yang muncul pada reaksi yang diberi cetakan.

PCR

Reaksi PCR dilakukan pada volume reaksi 10 μ L dengan campuran reaksi GoTaq[®] Green Master Mix 1 \times , primer F3 dan B3 masing-masing 1 μ M dan DNA cetakan 1 μ L. Reaksi dilakukan dengan predenaturasi pada 95 $^{\circ}$ C selama 5 menit diikuti 35 siklus yang terdiri dari denaturasi pada 95 $^{\circ}$ C selama 1 menit, penempelan primer yang divariasikan untuk optimasi pada 51, 53, 55, 57 dan 59 $^{\circ}$ C selama 1 menit dan elongasi pada 72 $^{\circ}$ C selama 30 detik. Hasil reaksi divisualisasi dengan elektroforesis gel agarosa 1,5% dengan hasil optimal berupa larik DNA tunggal berukuran 229 bp.

Uji spesifisitas deteksi dilakukan dengan menggunakan DNA dari *Escherichia coli* dan *Vibrio harveyi* sebagai pembanding. Reaksi PCR dilakukan sesuai yang telah disebutkan menggunakan suhu optimum untuk penempelan primer. Uji batas deteksi dilakukan dengan menggunakan dua sumber DNA cetakan, yakni DNA yang diperoleh melalui *thermallysis* maupun metode Chen & Kuo. DNA yang diperoleh diencerkan sebanyak 10 kali lipat hingga tingkat pengenceran 10⁻⁴ kadar DNA awal. DNA cetakan tersebut kemudian digunakan sebagai cetakan dalam reaksi PCR yang dijabarkan sebelumnya. Hasil PCR divisualisasi dengan elektroforesis gel agarosa 1,5% dengan larik berukuran 229 bp pada *Vibrio harveyi*.

HASIL dan BAHASAN

Desain Primer

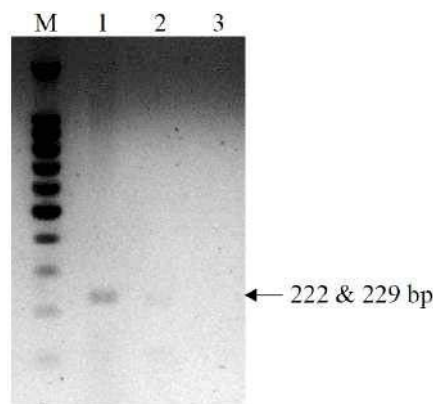
Primer LAMP didesain agar dapat mengamplifikasi segmen gen *toxR* yang spesifik pada *Vibrio harveyi*. Hal ini dilakukan karena gen *toxR* memiliki variasi interspesies genus *Vibrio* yang cukup tinggi sehingga dapat digunakan untuk membedakan spesies *Vibrio* (Pascual, Macian, Arahal, Garay & Pujalte, 2010). Desain primer baru akan mengamplifikasi basa ke-126 hingga 354 dari gen *toxR* dengan daerah kosong pada sebanyak 46 basa yang dapat menjadi daerah target primer *stem* serta 28 dan 26 basa yang dapat menjadi daerah target primer *loop* (Tabel 1). Primer yang didesain memiliki T_m F2 dan B2 yang berada dalam rentang 60-65 $^{\circ}$ C sehingga

dapat menempel pada suhu reaksi polimerisasi oleh *Bst* DNA polimerase. Selain itu, T_m F1c dan B1c juga lebih tinggi dari F2 dan B2 sehingga memudahkan pembentukan struktur *loop* saat amplifikasi (Notomi *et al.*, 2000).

Tabel 1

Karakteristik dan sekuens primer LAMP untuk deteksi Vibrio harveyi

Nama	Letak	T_m (°C)	Sekuens
<i>toxR</i> -F3	126-144	63,6	TCTACTCATGTTGGCAGAG
<i>toxR</i> -B3	337-354	61,6	AGATAGTGGGCTTAAACG
<i>toxR</i> -FIP	194-213 (F1c)	69,5 (F1c)	CACCTCAAAACCTGCTCCC
(F1c-F2)	145-165 (F2)	65,2 (F2)	AGACCCAATGAAGTGTTAACG
<i>toxR</i> -BIP	260-281 (B1c)	68 (B1c)	TGAAAGACTCTACGAAGTCGC
(B1c-B2)	308-324 (B2)	62,5 (B2)	CAATCAGTTGGTAACCGC

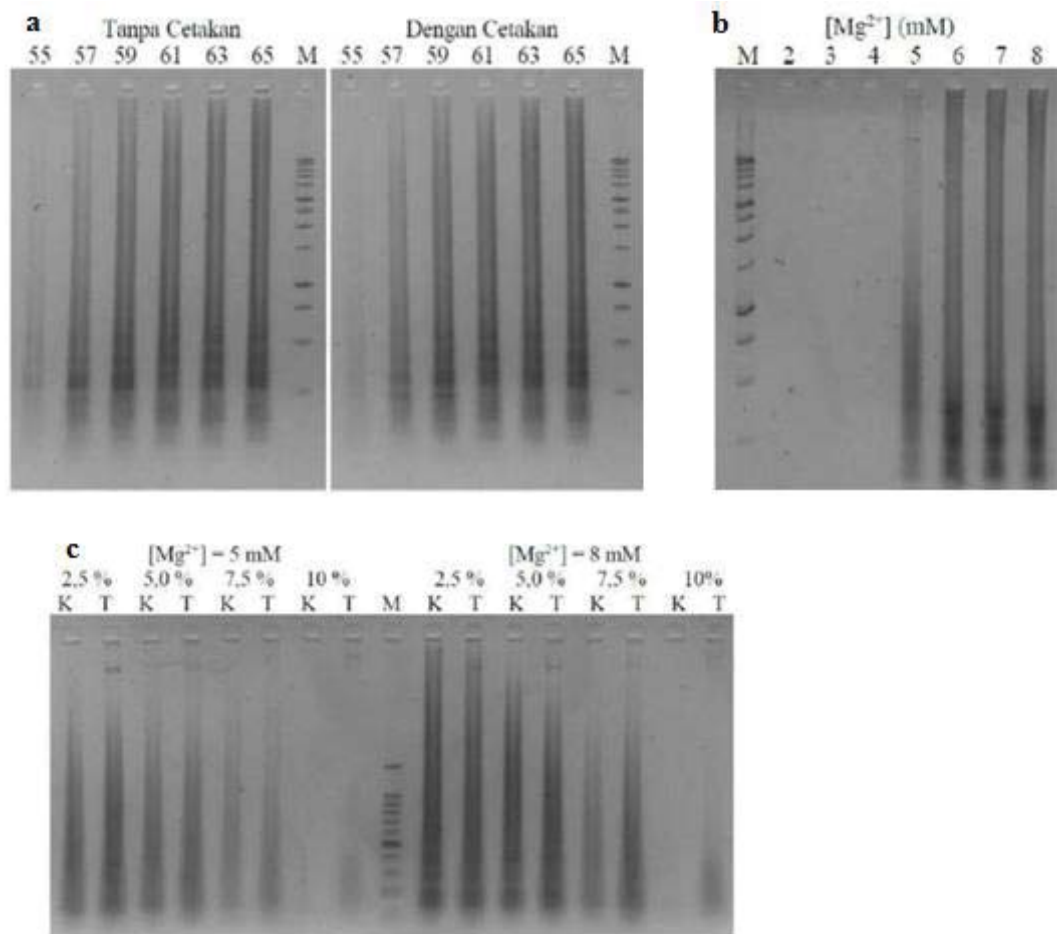


Gambar 1. Hasil PCR menggunakan primer F3 & B3 (1), *nested*-PCR dengan primer FIP & BIP (2) dan kontrol (3). M adalah *marker* 100 bp.

Primer yang baru saja didesain telah dipastikan dapat menempel pada DNA cetakan sesuai dengan posisi yang diharapkan. Hasil PCR menunjukkan primer F3 dan B3 dapat menempel dan menghasilkan produk amplifikasi berukuran 229 bp, sementara *nested*-PCR dengan primer FIP dan BIP menghasilkan produk amplifikasi berukuran 222 bp (Gambar 1). Terbentuknya produk pada reaksi *nested*-PCR menunjukkan kemampuan primer FIP dan BIP untuk menempel di antara sekuens primer F3 dan B3 sebagaimana permodelan dalam LAMP. Metode pembuktian yang mirip juga pernah dilakukan untuk menguji spesifisitas primer LAMP hanya dengan menggunakan F3 dan B3 (Fernandez-Soto *et al.*, 2014).

Deteksi dengan LAMP

Suhu reaksi optimum untuk reaksi amplifikasi berkisar di antar 59-65°C (Gambar 2a). Hal ini dikarenakan pada suhu 60-65°C merupakan suhu optimum bagi aktivitas polimerisasi pada *Bst* DNA Polimerase. Selain itu, terbentuknya hasil amplifikasi pada suhu tersebut menunjukkan kemampuan primer untuk dapat menempel pada cetakan pada suhu reaksi tersebut (Notomi *et al.*, 2000). Akan tetapi, produk amplifikasi juga dijumpai pada reaksi kontrol yang tidak menggunakan DNA cetakan. Oleh karena itu, kondisi reaksi LAMP dilakukan optimasi untuk mencegah kemunculan hasil *false positive*.



Gambar 2. Optimasi reaksi LAMP pada variasi suhu (dalam °C) (a), kadar Mg^{2+} (b), kadar DMSO (c) dan lama reaksi (d). M adalah *ladder* 1 kb (a & b) dan 100 bp (c & d), K adalah kontrol tanpa cetakan, T adalah reaksi dengan cetakan.

Hasil *false positive* dapat disebabkan oleh beberapa hal, salah satunya adalah dimer primer. Berbagai parameter yang berpotensi menyebabkan dimer primer dioptimasi untuk mencegah hasil *false positive*. Variasi kadar $MgSO_4$ menunjukkan bahwa hasil *false positive* membutuhkan kadar Mg^{2+} minimal 5 mM. Penggunaan $MgSO_4$ pada kadar yang lebih rendah tidak akan menghasilkan reaksi amplifikasi (Gambar 2b). Akan tetapi, pada kadar Mg^{2+} sebesar 4 mM, campuran reaksi yang menggunakan cetakan menunjukkan hasil *false negative* (data tidak ditampilkan).

DMSO dapat ditambahkan untuk menurunkan hasil *false positive* karena dapat mengganggu ikatan antar nukleotida (Notomi *et al.*, 2000). Hal ini ditunjukkan dengan seiring dengan peningkatan kadar DMSO maka terjadi penurunan intensitas hasil amplifikasi (Gambar 2c). Akan tetapi pemberian DMSO tidak dapat mencegah terbentuknya hasil *false positive* pada penelitian ini. Pada kadar DMSO 10%, reaksi amplifikasi sama sekali tidak terjadi. Hal ini disebabkan DMSO dapat mengganggu aktivitas *Bst* DNA polimerase pada kadar yang terlalu tinggi (Wang, Brewster, Paul, & Tomasula, 2015).

Metode lainnya yang dapat digunakan untuk memisahkan antara hasil *false positive* dengan hasil positif sejati adalah dengan mengurangi waktu reaksi. Hasil menunjukkan waktu minimum yang dibutuhkan untuk menghasilkan produk adalah 40 menit (Gambar 2d). Akan tetapi pada waktu minimum tersebut tetap terjadi *false positive*. Hal tersebut merupakan salah satu permasalahan yang sering terjadi dalam pengembangan metode LAMP untuk deteksi.

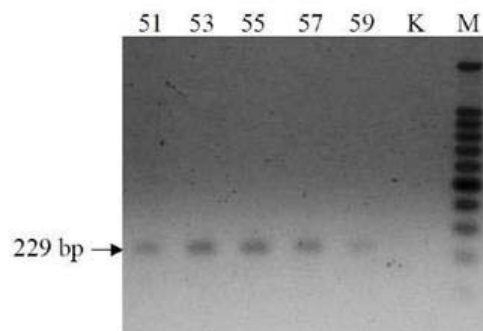
Berdasarkan usaha optimasi yang telah dilakukan saat ini, metode LAMP belum dapat diterapkan untuk deteksi *Vibrio harveyi*.

Perolehan hasil *false positive* pada LAMP dapat disebabkan oleh beberapa hal, misalnya *self-amplification* akibat terbentuknya dimer primer ataupun struktur sekunder berupa *hairpin*. Pembentukan struktur sekunder ataupun dimer diketahui dapat menunjukkan reaksi polimerisasi meskipun mekanisme terjadinya reaksi belum diketahui secara pasti. Hal ini disebabkan dalam desain primer LAMP tidak dapat dilakukan dengan mengikuti protokol desain primer secara umum. Beberapa penelitian juga mendapat hasil *false positive* meskipun menggunakan parameter penapisan primer yang telah berhasil untuk mendesain primer lainnya. Penelitian lain menunjukkan bahwa dengan mengoptimasi desain primer dapat menurunkan hasil *false positive*, yakni dengan menggeser sekuens target yang lebih sulit membentuk interaksi sekunder ataupun dimer (Meagher, Priye, Light, Huang, & Wang, 2018).

Faktor lain penyebab terjadinya *false positive* adalah terjadinya kontaminasi. Sebagai metode yang sensitif, LAMP dapat memberikan hasil positif apabila terdapat kontaminasi meskipun dalam jumlah yang sangat sedikit, misalnya dari aerosol yang mengandung DNA sasaran (Hsieh, Mage, Csordas, Eisenstein, & Soh, 2014). Kontaminasi dari sumber eksternal dapat dicegah dengan selalu menggunakan peralatan steril, mencampur DNA cetakan di tempat yang terpisah dengan reagen reaksi, menutup tabung dengan parafilm ataupun melakukan modifikasi UNG-LAMP (Fernandez-Soto et al., 2014; Dhama et al., 2014).

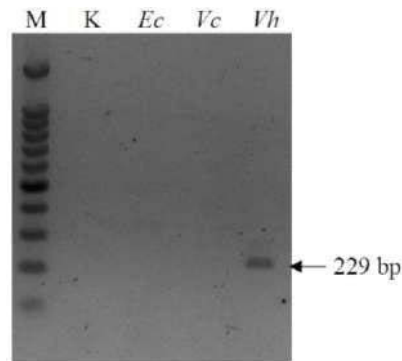
Deteksi dengan PCR

Reaksi PCR dilakukan menggunakan primer *outer* dari LAMP seperti yang dilakukan oleh Fernandez-Soto et al. (2014). Variasi suhu penempelan primer pada 51-59°C menunjukkan hanya terdapat larik tunggal berukuran 229 bp (Gambar 3). Reaksi PCR yang dilakukan dalam deteksi *Vibrio harveyi* selanjutnya akan dilakukan dengan suhu penempelan primer 59°C. Hal ini dilakukan untuk mencegah terjadinya reaksi silang antar primer dengan DNA dari bakteri yang berbeda jauh.



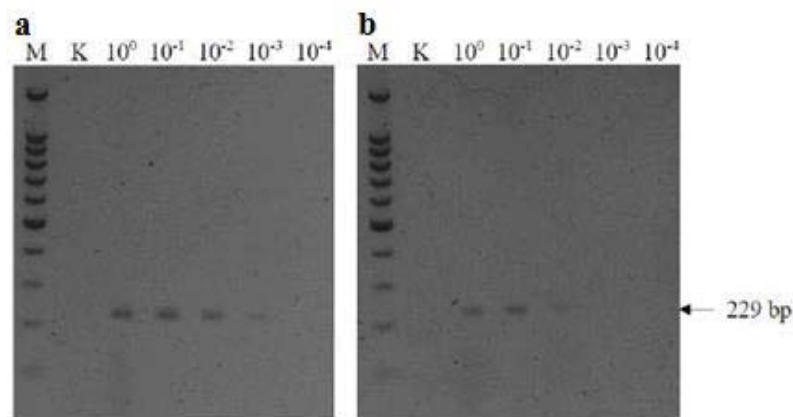
Gambar 3. Optimasi suhu penempelan primer. M adalah *ladder* 100 bp. Suhu dalam Celcius.

Pengujian terhadap pembentukan reaksi silang dilakukan dengan 2 bakteri lain yakni *Vibrio cholerae* dan *Escherichia coli*. Primer *outer* yang didesain tidak menunjukkan adanya reaksi silang dengan kedua bakteri tersebut (Gambar 4). Hal ini menandakan bahwa primer tersebut spesifik dan dapat digunakan untuk deteksi *Vibrio harveyi*. Hal ini dikarenakan gen *toxR* hanya dimiliki kelompok *Vibrionaceae* serta memiliki diversitas yang tinggi (Conejero & Hedreyda, 2003). Diversitas yang tinggi pada gen *toxR* menyebabkan terdapat variasi yang cukup besar antar spesies *Vibrio* tetapi memiliki kemiripan yang cukup tinggi dalam satu spesies sehingga dapat digunakan untuk identifikasi bakteri *Vibrio* (Pascual, Macian, Arahall, Garay, & Pujalte, 2010).



Gambar 4. Pengujian spesifisitas primer pada *Escherichia coli* (*Ec*), *Vibrio cholerae* (*Vc*) dan *Vibrio harveyi* (*Vh*). M adalah ladder 100 bp dan K adalah kontrol.

Batas deteksi diukur menggunakan DNA dengan 2 metode ekstraksi yang berbeda pada berbagai tingkat pengenceran 10 kali. Produk amplifikasi berukuran 229 bp dapat teramati hingga tingkat pengenceran 10^{-3} menggunakan DNA yang diekstraksi dengan *thermal lysis* juga 10^{-2} menggunakan DNA yang diekstraksi dengan Chen & Kuo (Gambar 5). Berdasarkan kadar DNA yang diekstraksi, DNA yang diperoleh dengan *thermal lysis* dapat terdeteksi hingga $0,526 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ sementara DNA yang diperoleh dengan metode Chen & Kuo dapat terdeteksi hingga $2,605 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$. Hal ini dikarenakan tidak ada DNA yang terbuang akibat proses pengendapan alkohol yang dilakukan pada metode Chen & Kuo sehingga memiliki rendemen yang lebih tinggi. Penelitian serupa untuk mendeteksi *Loa loa* menggunakan PCR juga mendapatkan batas deteksi hingga 0,5 ng tiap reaksinya (Fernandez-Soto *et al.*, 2014). Apabila ditentukan berdasarkan jumlah bakteri yang digunakan, primer ini dapat mendeteksi hingga $2,09 \times 10^6 \text{ CFU.mL}^{-1}$.



Gambar 5. Batas deteksi *Vibrio harveyi* dengan metode ekstraksi DNA thermal lysis (a) dan Chen & Kuo (b). M adalah ladder 100 bp dan K adalah kontrol.

Primer yang digunakan dalam penelitian ini secara umum masih tidak cukup sensitif. Hal ini dikarenakan batas deteksi dari sebagian besar galur *Vibrio harveyi* (Saulnier, Haffner, Goarant, Levy & Ansquer, 2000). Akan tetapi walaupun primer yang digunakan dalam penelitian ini kurang sensitif dibandingkan penelitian lain yang dapat mendeteksi hingga $4.000 \text{ sel.mL}^{-1}$, namun primer ini telah dibuktikan dapat digunakan untuk deteksi DNA yang diekstraksi dengan *thermal lysis* (Pang *et al.*, 2006). Primer ini juga cenderung lebih spesifik dan lebih sensitif dibandingkan penggunaan primer yang berbasis 16S rDNA untuk deteksi *Vibrio harveyi* (Oakey, Levy, Bourne, Cullen, & Thomas, 2003).

SIMPULAN

Desain primer LAMP untuk deteksi *Vibrio harveyi* dengan daerah kosong sebesar 47 bp untuk penempelan primer *stem* serta 28 dan 26 bp untuk penempelan primer *loop* telah berhasil dibuat. Akan tetapi, primer tersebut tidak dapat digunakan untuk deteksi LAMP karena terjadi *false positive*. Sementara itu, primer *outer* (F3 & B3) dapat digunakan untuk deteksi *Vibrio harveyi* secara spesifik hingga 0,526 ng.µL⁻¹.

Primer *outer* yang didesain dalam penelitian ini masih dapat dikembangkan lebih lanjut dengan meningkatkan sensitivitas serta menguji spesifisitas terhadap beberapa galur *Vibrio harveyi* dan pengujian reaksi silang dengan *Vibrio* lainnya. Sementara itu, primer LAMP dapat diuji ulang untuk memastikan keberadaan *false positive* disebabkan oleh dimer primer atau pembentukan struktur sekunder dan bukan dikarenakan terjadi kontaminasi.

PUSTAKA ACUAN

- Austin, B, 2010, 'Vibrios as casual agents of zoonoses', *Veterinary Microbiology*, 140(3-4), 310-317.
- Austin, B, & Zhang, XH, 2006, 'Vibrio harveyi: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates', *Letters in Applied Microbiology*, 43(2), 119-124.
- Cao, YT, Wu, ZH, Jian, JC, & Lu, YS, 2010, 'Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for the rapid detection of *Vibrio harveyi* in cultured marine shellfish', *Letters in Applied Microbiology*, 51(1), 24-29.
- Chen, WP, & Kuo, TT, 1993, 'A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA', *Nucleic Acid Research*, 21(9), 2260.
- Conejero, MJ, & Hedreyda, CT, 2003, 'Isolation of partial *toxR* gene of *Vibrio harveyi* and design of *toxR*-targeted PCR primers for species detection'. *Journal of Applied Microbiology*, 95(3), 602-611.
- Dhama, K, Karthik, K, Chakraborty, S, Tiwari, R, Kapoor, S, Kumar, A, & Thomas, P, 2014, 'Loop-mediated Isothermal Amplification of DNA (LAMP): A new diagnostic tool lights the world of diagnosis of animal and human pathogens: A review', *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 17(2), 151-166.
- Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya, n.d., 'Udang Vaname dan Udang Windu Masih Andalan Ekspor Indonesia', Retrieved Juni 15, 2018, from Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya: http://www.djpb.kkp.go.id/arsip/c/246/Udang-Vannamei-dan-Udang-Windu-Masih-AndalanEkspor-Indonesia/?category_id=13
- Felix, F, Nugroho, TT., Silalahi, S, & Octavia, Y, 2011, 'Skrining bakteri *Vibrio* sp. asli Indonesia sebagai penyebab penyakit udang berbasis teknik 16S ribosomal DNA', *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*, 3(2), 85-99.
- Fernandez-Soto, P, Mvoulouga, PO, Akue, JP., Aban, JL, Santiago, BV., Sanchez, MC., & Muro, A, 2014, 'Development of a highly sensitive Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Method for the Detection of *Loa loa*', *PLOS One*, 9(4), e94664.
- Gandelman, O, Jackson, R, Kiddle, G, & Tisi, L, 2011, 'Loop-Mediated Amplification accelerated by stem primers', *International Journal of Molecular Sciences*, 12(12), 9108-9124.
- Garno, YS, 2004, 'Pengembangan budidaya udang dan pencemarannya pada perairan pesisir', *Jurnal Teknologi Lingkungan*, 5(3), 187-192.
- Hsieh, K, Mage, PL, Csordas, AT, Eisenstein, M, & Soh, HT, 2014, 'Simultaneous elimination of carryover contamination and detection of DNA with uracil-DNA-glycosylase-supplemented loop-mediated isothermal amplification (UDG-LAMP)', *Chemical Communications*, 50(28), 3747-3749.
- Hundenborn, J, Thurig, S, Kommerell, M, Haag, H, & Nolte, O, 2013, 'Severe wound infection with *Photobacterium damsela* ssp. *damsela* and *Vibrio harveyi*, following a laceration injury in marine environment: A case report and review of the literature', *Case Reports*

- in Medicine*, 2013, 1-7.
- Liu, PC, Lee, KK, & Chen, SN, 1996, Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn, *Penaeus monodon*, *Letters in Applied Microbiology*, 22(6), 413-416.
- Meagher, RJ, Priye, A, Light, YK, Huang, C, & Wang, E, 2018, Impact of primer dimers and self-amplifying hairpins on reverse transcription loop-mediated isothermal amplification detection of viral RNA, *Analyst*, 143(8), 1924-1933.
- Nagamine, K, Hase, T, & Notomi, T, 2002, 'Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers', *Molecular and Cellular Probes*, 16(3), 223-229.
- Notomi, T, Okayama, H, Masubuchi, H, Yonekawa, T, Watanabe, K, Amino, N, & Hase, T, 2000, 'Loop-mediated isothermal amplification of DNA', *Nucleic Acids Research*, 28(12), e63.
- Oakey, HJ, Levy, N, Bourne, DG, Cullen, B, & Thomas, A, 2003, 'The use of PCR to aid in the rapid identification of *Vibrio harveyi* isolates', *Journal of Applied Microbiology*, 95(6), 1293-1303.
- Pang, L, Zhang, XH., Zhong, Y, Chen, J, Li, Y, & Austin, B, 2006, 'Identification of *vibrio harveyi* using PCR amplification of the *toxR* gene', *Letters in Applied Microbiology*, 43(3), 249-255.
- Pascual, J, Macian, MC, Arahal, DR, Garay, E, & Pujalte, MJ, 2010, 'Multilocus sequence analysis of central clade of the genus *Vibrio* by using the 16S rRNA, *recA*, *pyrH*, *rpoD*, *gyrB*, *rctB* and *toxR* genes', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 154-165.
- Robertson, PA, Calderon, J, Carrera, L, Stark, JR Zherdmant, M, & Austin, B, 1998, 'Experimental *Vibrio harveyi* infections in *Penaeus vannamei* larvae', *Diseases of Aquatic Organisms*, 32, 151-155.
- Saulnier, D, Haffner, P, Goarant, C, Levy, P, & Ansquer, D, 2000, 'Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: A review', *Aquaculture*, 191(1-3), 133-144.
- Wang, D-G, Brewster, JD, Paul, M, & Tomasula, PM, 2015, 'Two methods for increased specificity and sensitivity in Loop-Mediated Isothermal Amplification', *Molecules*, 20(4), 6048-6059.

2775-Article_Text-6300-1-10- 20200324.pdf

by Sulistyو Calvin

Submission date: 07-Apr-2021 04:08PM (UTC+0700)

Submission ID: 1552644184

File name: 2775-Article_Text-6300-1-10-20200324.pdf (368.22K)

Word count: 4028

Character count: 23720

Original Research

Deteksi *Vibrio Harveyi* Dengan Metode Amplifikasi DNA pada Gen *toxR*

Calvin Wijaya Johan ^{1*}, Sulistyo Emantoko Dwi Putra ¹, Ernest Suryadjaja ¹

¹ Fakultas Teknobiologi, Universitas Surabaya, Raya Kalirungkut Surabaya-Indonesia 60293

*corresponding author: calvin_wijaya_johan@yahoo.com

Abstract-*Vibrio harveyi* infection in aquacultures may cause death and economical loss. Rapid detection of this bacteria may prevent its dispersal in aquacultures. The goal of this research was to develop method in detection of *Vibrio harveyi* via amplification of *toxR* gene. DNA amplification was carried out with two methods, loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and polymerase chain reaction (PCR). Amplification with LAMP suggest optimization of either protocol or primer design was needed to prevents false positive results. Amplification with PCR yields 229 bp-length product specific to *Vibrio harveyi* with detection limit up to 0.526 ng. μL^{-1} (equals to 2.09×10^6 CFU.mL⁻¹).

Keywords: Aquaculture, LAMP, PCR, *toxR*, *Vibrio harveyi*

Abstrak-Infeksi hewan akuakultur oleh *Vibrio harveyi* dapat menyebabkan kematian serta kerugian ekonomi. Kemampuan untuk mendeteksi bakteri tersebut secara dini dapat mencegah penyebarannya dalam akuakultur. Penelitian ini bertujuan mengembangkan metode untuk mendeteksi *Vibrio harveyi* melalui amplifikasi gen *toxR*. Amplifikasi DNA dilakukan dengan dua metode, yakni amplifikasi isothermal termediasi loop (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) dan reaksi berantai polimerase (PCR). Amplifikasi menggunakan metode LAMP menunjukkan perlu dilakukan optimasi protokol maupun desain primer untuk mencegah perolehan hasil false positive. Amplifikasi menggunakan metode PCR menghasilkan produk berukuran 229 pasang basa yang spesifik pada *Vibrio harveyi* dengan batas deteksi hingga 0,526 ng. μL^{-1} (setara $2,09 \times 10^6$ CFU.mL⁻¹).

Kata kunci: Akuakultur, LAMP, PCR, *toxR*, *Vibrio harveyi*

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara kepulauan terbesar di dunia dengan potensi budidaya udang yang cukup besar. Hal ini terlihat dari kemampuan Indonesia dalam menghasilkan 400 kg udang untuk setiap hektar pertambakan udang tiap tahunnya (Garno, 2004). Udang yang menjadi komoditas unggulan Indonesia ada dua, yakni udang Windu (*Penaeus monodon*) dan udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*). Pada tahun 2013 sebanyak 25,4% udang yang dihasilkan diekspor oleh Indonesia ke negara lainnya (Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya, n.d.). Oleh karena itu produksi udang di Indonesia perlu dihindarkan dari faktor-faktor penyebab kegagalan panen, misalnya terserang penyakit.

Vibrio harveyi adalah bakteri Gram negatif yang dapat berluminesens dan merupakan patogen bagi udang yang banyak dijumpai di perairan laut (Austin & Zhang, 2006). Bakteri ini dapat dijumpai di perairan Indonesia dan dapat menginfeksi udang Windu maupun udang Vaname (Felix, Nugroho, Silalahi, & Octavia, 2011; Robertson *et al.*, 1998; Liu, Lee, & Chen, 1996). Infeksi oleh *Vibrio harveyi* dapat menyebabkan berbagai gejala seperti lesu, tidak nafsu makan, kerusakan organ dan dapat berakibat pada kematian (Austin, 2010). Oleh karena itu, untuk mencegah penyebaran bakteri tersebut ke dalam akuakultur diperlukan metode untuk mendeteksi keberadaan bakteri tersebut.

Deteksi *Vibrio harveyi* dapat dilakukan dengan metode konvensional maupun metode molekuler. Metode molekuler seperti amplifikasi DNA umumnya lebih sering digunakan karena dapat digunakan untuk mendeteksi lebih cepat (Hundenborn, Thurig, Kommerell, Haag, & Nolte, 2013). Metode amplifikasi DNA yang paling banyak digunakan adalah menggunakan PCR. PCR telah digunakan untuk mendeteksi *Vibrio harveyi* dengan berbagai gen sasaran,

misalnya 16S rDNA maupun gen *toxR* (Pang *et al.*, 2006; Oakey, Levy, Bourne, Cullen & Thomas, 2003). Akan tetapi, metode PCR dalam penelitian sebelumnya memiliki kelemahan baik dalam spesifisitas maupun waktu deteksi.

Metode lainnya yang dapat digunakan untuk amplifikasi DNA adalah LAMP. Metode ini menggunakan 2 pasang primer untuk mengenali 6 daerah pada DNA cetakan sehingga memiliki spesifisitas yang lebih baik. LAMP juga menggunakan enzim *Bst* polimerase yang memiliki aktivitas *strand-displacement* untuk melakukan amplifikasi pada satu suhu dengan lama reaksi hanya satu jam (Notomi *et al.*, 2000). Kecepatan reaksi dapat dipercepat dengan menggunakan primer *loop* dan primer *stem* (Gandelman, Jackson, Kiddle, & Tisi, 2011; Nagamine, Hase, & Notomi, 2002).

Deteksi *Vibrio harveyi* dengan LAMP telah dilakukan, namun tidak menggunakan primer *stem* ataupun primer *loop* untuk mempercepat reaksi (Cao, Wu, Jian, & Lu, 2010). Penelitian ini membuat desain primer LAMP baru untuk mendeteksi *Vibrio harveyi* yang menyediakan tempat untuk penempelan primer *stem* dan primer *loop*. Desain primer yang dihasilkan kemudian diuji apakah dapat digunakan untuk deteksi dengan metode LAMP. Di samping itu, primer luar digunakan untuk deteksi dengan metode PCR.

METODE PENELITIAN

Biakan dan Kultivasi Bakteri

Biakan *Vibrio harveyi* yang diperoleh dari Balai Pengembangan Perikanan dan Budidaya Air Payau dibiakan di medium *tryptic soy agar* atau *tryptic soy broth* yang diperkaya dengan NaCl 2,5% pada suhu 28°C. Biakan *Vibrio cholerae* dan *Escherichia coli* diperoleh dari Laboratorium Bioteknologi Mikroorganisme Fakultas Teknobiologi Universitas Surabaya. *Vibrio cholerae* dan *Escherichia coli* dibiakan di medium *tryptic soy agar* atau *tryptic soy broth* yang diperkaya dengan NaCl 2,5% pada suhu 37°C.

Isolasi DNA Bakteri

Isolasi DNA dilakukan dengan dua metode, yakni *thermal lysis* dan Chen & Kuo (1993). Metode *thermal lysis* dilakukan dengan mengendapkan 1,5 mL biakan bakteri dengan sentrifugasi pada 12.000 rpm selama 3 menit. Pelet diresuspendi menggunakan 50 µL ddH₂O kemudian dididihkan selama 5 menit. Debris sel kemudian diendapkan dengan sentrifugasi pada 12.000 rpm selama 3 menit. Supernatan kemudian diambil dan digunakan sebagai cetakan untuk reaksi amplifikasi.

Metode Chen dan Kuo dilakukan dengan mengendapkan 1,5 mL biakan bakteri dengan sentrifugasi pada 12.000 rpm selama 3 menit. Pelet diresuspendi dengan 200 µL *lysis buffer* (Tris-asetat 40 mM pH 8,0, Na-asetat 20 mM, 1 mM EDTA, SDS 1%) kemudian ditambahkan 66 µL NaCl 5 M dan diendapkan dengan sentrifugasi pada 12.000 rpm selama 10 menit pada 4°C. Supernatan diambil dan ditambahkan kloroform dengan volume yang sama kemudian dibolak-balik hingga terbentuk campuran berwarna putih susu. Campuran kemudian disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 3 menit kemudian fase air diambil dan dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi baru. Etanol absolut dingin dengan volume 2 kali volume fase air yang terambil ditambahkan dan dibolak-balik hingga homogen. Campuran didiamkan selama 2-4 jam di dalam bak es sebelum disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 3 menit pada suhu 4°C. Pelet yang terbentuk kemudian dicuci dengan etanol 70% sebanyak 2 kali sebelum dilarutkan dengan 50 µL ddH₂O.

Desain Primer dan Uji Penempelan Primer

Primer LAMP didesain menggunakan piranti lunak PrimerExplorer V5 (<http://primerexplorer.jp/lampv5e/index.html>) sesuai dengan panduan "A Guide to LAMP primer designing" (http://primerexplorer.jp/e/v4_manual/index.html). Sekuens *Vibrio harveyi* yang digunakan merupakan sekuens gen *toxR* yang terkonservasi pada beberapa galur *Vibrio harveyi*

(DQ503438.1, DQ640261.1, DQ640260.1, DQ640259.1, DQ640258.1, DQ640255.1, DQ517446.1 dan DQ403146.1) yang diperoleh dari pangkalan data GenBank.

Penempelan primer *outer* (F3 & B3) diuji menggunakan reaksi PCR. Reaksi PCR dilakukan pada campuran reaksi 10 μ L yang mengandung GoTaq[®] Green Master Mix 1 \times (Promega), primer F3 dan B3 masing-masing 1 μ M dan 1 μ L DNA cetakan dengan produk amplifikasi yang diharapkan berukuran 229 bp. Hasil PCR kemudian diencerkan 50 kali dan digunakan sebagai cetakan dalam reaksi *nested*- PCR untuk menguji kemampuan penempelan primer *inner* (FIP & BIP). *Nested*- PCR dilakukan pada campuran reaksi 10 μ L yang mengandung GoTaq[®] Green Master Mix 1 \times (Promega), primer FIP dan BIP masing-masing 1,6 μ M dan 1 μ L DNA cetakan dengan produk amplifikasi yang diharapkan berukuran 222 bp. Kedua reaksi PCR dilakukan dengan predenaturasi pada 95°C selama 5 menit, 30 siklus yang tersusun atas denaturasi pada 95°C selama 1 menit, penempelan primer pada 53°C selama 1 menit dan elongasi pada 72°C selama 30 detik.

LAMP

Reaksi LAMP dilakukan pada volume reaksi 10 μ L dengan campuran reaksi dasar Tris-Cl pH 8,8 20 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, KCl 50 mM, Tween[®] 0,1%, dNTP 1,4 mM, *Bst* 2.0 WarmStart[®] DNA Polymerase 8 U dan 0,4 μ L DNA cetakan. Suhu optimum reaksi ditentukan melalui variasi suhu reaksi 55, 57, 59, 61, 63 dan 65°C selama 1 jam diikuti dengan pemanasan pada 85°C selama 3 menit. Kadar MgSO₄ juga divariasikan pada 2-8 mM sementara kadar DMSO yang ditambahkan divariasikan pada 2,5-10%. Waktu reaksi juga divariasikan pada 35, 40 dan 45 menit. Hasil reaksi divisualisasi dengan elektroforesis gel agarosa 1,5 %. Hasil positif ditunjukkan dengan keberadaan larik serupa tangga yang muncul pada reaksi yang diberi cetakan.

PCR

Reaksi PCR dilakukan pada volume reaksi 10 μ L dengan campuran reaksi GoTaq[®] Green Master Mix 1 \times , primer F3 dan B3 masing-masing 1 μ M dan DNA cetakan 1 μ L. Reaksi dilakukan dengan predenaturasi pada 95°C selama 5 menit diikuti 35 siklus yang terdiri dari denaturasi pada 95°C selama 1 menit, penempelan primer yang divariasikan untuk optimasi pada 51, 53, 55, 57 dan 59°C selama 1 menit dan elongasi pada 72°C selama 30 detik. Hasil reaksi divisualisasi dengan elektroforesis gel agarosa 1,5% dengan hasil optimal berupa larik DNA tunggal berukuran 229 bp.

Uji spesifisitas deteksi dilakukan dengan menggunakan DNA dari *Escherichia coli* dan *Vibrio harveyi* sebagai pembanding. Reaksi PCR dilakukan sesuai yang telah disebutkan menggunakan suhu optimum untuk penempelan primer. Uji batas deteksi dilakukan dengan menggunakan dua sumber DNA cetakan, yakni DNA yang diperoleh melalui *thermallysis* maupun metode Chen & Kuo. DNA yang diperoleh diencerkan sebanyak 10 kali lipat hingga tingkat pengenceran 10⁻⁴ kadar DNA awal. DNA cetakan tersebut kemudian digunakan sebagai cetakan dalam reaksi PCR yang dijabarkan sebelumnya. Hasil PCR divisualisasi dengan elektroforesis gel agarosa 1,5% dengan larik berukuran 229 bp pada *Vibrio harveyi*.

HASIL dan BAHASAN

Desain Primer

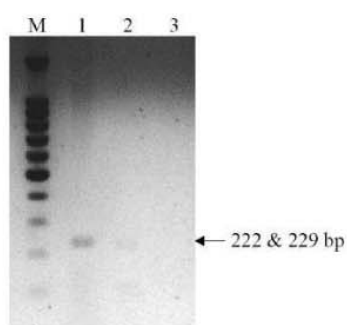
Primer LAMP didesain agar dapat mengamplifikasi segmen gen *toxR* yang spesifik pada *Vibrio harveyi*. Hal ini dilakukan karena gen *toxR* memiliki variasi interspesies genus *Vibrio* yang cukup tinggi sehingga dapat digunakan untuk membedakan spesies *Vibrio* (Pascual, Macian, Arahal, Garay & Pujalte, 2010). Desain primer baru akan mengamplifikasi basa ke-126 hingga 354 dari gen *toxR* dengan daerah kosong pada sebanyak 46 basa yang dapat menjadi daerah target primer *stem* serta 28 dan 26 basa yang dapat menjadi daerah target primer *loop* (Tabel 1). Primer yang didesain memiliki T_m F2 dan B2 yang berada dalam rentang 60-65°C sehingga

dapat menempel pada suhu reaksi polimerisasi oleh *Bst* DNA polimerase. Selain itu, T_m F1c dan B1c juga lebih tinggi dari F2 dan B2 sehingga memudahkan pembentukan struktur *loop* saat amplifikasi (Notomi *et al.*, 2000).

Tabel 1

Karakteristik dan sekuens primer LAMP untuk deteksi Vibrio harveyi

Nama	Letak	T_m (°C)	Sekuens
<i>toxR</i> -F3	126-144	63,6	TCTACTCATGTTGGCAGAG
<i>toxR</i> -B3	337-354	61,6	AGATAGTGGGCTTAAACG
<i>toxR</i> -FIP	194-213 (F1c)	69,5 (F1c)	CACCTCAAAACCCTGCTCCC
(F1c-F2)	145-165 (F2)	65,2 (F2)	AGACCCAATGAAGTGTTAACG
<i>toxR</i> -BIP	260-281 (B1c)	68 (B1c)	TGAAAGACTCTACGAAGTCGC
(B1c-B2)	308-324 (B2)	62,5 (B2)	CAATCAGTTGGTAACCGC

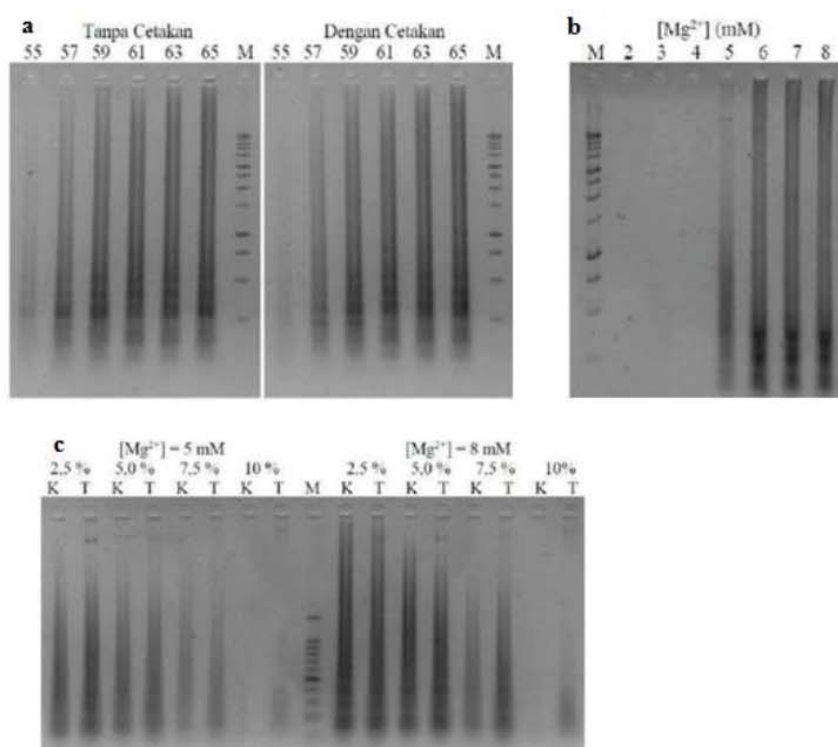


Gambar 1. Hasil PCR menggunakan primer F3 & B3 (1), *nested*-PCR dengan primer FIP & BIP (2) dan kontrol (3). M adalah *marker* 100 bp.

Primer yang baru saja didesain telah dipastikan dapat menempel pada DNA cetakan sesuai dengan posisi yang diharapkan. Hasil PCR menunjukkan primer F3 dan B3 dapat menempel dan menghasilkan produk amplifikasi berukuran 229 bp, sementara *nested*-PCR dengan primer FIP dan BIP menghasilkan produk amplifikasi berukuran 222 bp (Gambar 1). Terbentuknya produk pada reaksi *nested*-PCR menunjukkan kemampuan primer FIP dan BIP untuk menempel di antara sekuens primer F3 dan B3 sebagaimana permodelan dalam LAMP. Metode pembuktian yang mirip juga pernah dilakukan untuk menguji spesifisitas primer LAMP hanya dengan menggunakan F3 dan B3 (Fernandez-Soto *et al.*, 2014).

Deteksi dengan LAMP

Suhu reaksi optimum untuk reaksi amplifikasi berkisar di antar 59-65°C (Gambar 2a). Hal ini dikarenakan pada suhu 60-65°C merupakan suhu optimum bagi aktivitas polimerisasi pada *Bst* DNA Polimerase. Selain itu, terbentuknya hasil amplifikasi pada suhu tersebut menunjukkan kemampuan primer untuk dapat menempel pada cetakan pada suhu reaksi tersebut (Notomi *et al.*, 2000). Akan tetapi, produk amplifikasi juga dijumpai pada reaksi kontrol yang tidak menggunakan DNA cetakan. Oleh karena itu, kondisi reaksi LAMP dilakukan optimasi untuk mencegah kemunculan hasil *false positive*.



Gambar 2. Optimasi reaksi LAMP pada variasi suhu (dalam °C) (a), kadar Mg²⁺ (b), kadar DMSO (c) dan lama reaksi (d). M adalah ladder 1 kb (a & b) dan 100 bp (c & d), K adalah kontrol tanpa cetakan, T adalah reaksi dengan cetakan.

Hasil *false positive* dapat disebabkan oleh beberapa hal, salah satunya adalah dimer primer. Berbagai parameter yang berpotensi menyebabkan dimer primer dioptimasi untuk mencegah hasil *false positive*. Variasi kadar MgSO₄ menunjukkan bahwa hasil *false positive* membutuhkan kadar Mg²⁺ minimal 5 mM. Penggunaan MgSO₄ pada kadar yang lebih rendah tidak akan menghasilkan reaksi amplifikasi (Gambar 2b). Akan tetapi, pada kadar Mg²⁺ sebesar 4 mM, campuran reaksi yang menggunakan cetakan menunjukkan hasil *false negative* (data tidak ditampilkan).

DMSO dapat ditambahkan untuk menurunkan hasil *false positive* karena dapat mengganggu ikatan antar nukleotida (Notomi *et al.*, 2000). Hal ini ditunjukkan dengan seiring dengan peningkatan kadar DMSO maka terjadi penurunan intensitas hasil amplifikasi (Gambar 2c). Akan tetapi pemberian DMSO tidak dapat mencegah terbentuknya hasil *false positive* pada penelitian ini. Pada kadar DMSO 10%, reaksi amplifikasi sama sekali tidak terjadi. Hal ini disebabkan DMSO dapat mengganggu aktivitas *Bst* DNA polimerase pada kadar yang terlalu tinggi (Wang, Brewster, Paul, & Tomasula, 2015).

Metode lainnya yang dapat digunakan untuk memisahkan antara hasil *false positive* dengan hasil positif sejati adalah dengan mengurangi waktu reaksi. Hasil menunjukkan waktu minimum yang dibutuhkan untuk menghasilkan produk adalah 40 menit (Gambar 2d). Akan tetapi pada waktu minimum tersebut tetap terjadi *false positive*. Hal tersebut merupakan salah satu permasalahan yang sering terjadi dalam pengembangan metode LAMP untuk deteksi.

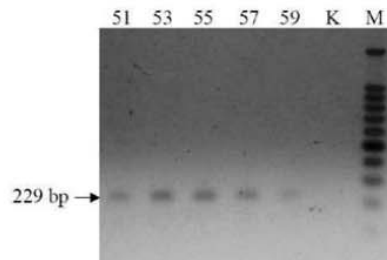
Berdasarkan usaha optimasi yang telah dilakukan saat ini, metode LAMP belum dapat diterapkan untuk deteksi *Vibrio harveyi*.

Perolehan hasil *false positive* pada LAMP dapat disebabkan oleh beberapa hal, misalnya *self-amplification* akibat terbentuknya dimer primer ataupun struktur sekunder berupa *hairpin*. Pembentukan struktur sekunder ataupun dimer diketahui dapat menunjukkan reaksi polimerisasi meskipun mekanisme terjadinya reaksi belum diketahui secara pasti. Hal ini disebabkan dalam desain primer LAMP tidak dapat dilakukan dengan mengikuti protokol desain primer secara umum. Beberapa penelitian juga mendapat hasil *false positive* meskipun menggunakan parameter penapisan primer yang telah berhasil untuk mendesain primer lainnya. Penelitian lain menunjukkan bahwa dengan mengoptimasi desain primer dapat menurunkan hasil *false positive*, yakni dengan menggeser sekuens target yang lebih sulit membentuk interaksi sekunder ataupun dimer (Meagher, Priye, Light, Huang, & Wang, 2018).

Faktor lain penyebab terjadinya *false positive* adalah terjadinya kontaminasi. Sebagai metode yang sensitif, LAMP dapat memberikan hasil positif apabila terdapat kontaminasi meskipun dalam jumlah yang sangat sedikit, misalnya dari aerosol yang mengandung DNA sasaran (Hsieh, Mage, Csordas, Eisenstein, & Soh, 2014). Kontaminasi dari sumber eksternal dapat dicegah dengan selalu menggunakan peralatan steril, mencampur DNA cetakan di tempat yang terpisah dengan reagen reaksi, menutup tabung dengan parafilm ataupun melakukan modifikasi UNG-LAMP (Fernandez-Soto et al., 2014; Dhama et al., 2014).

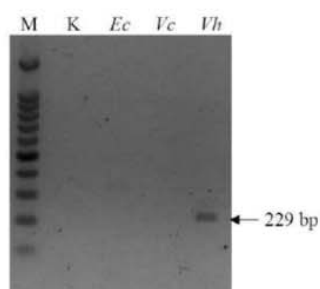
Deteksi dengan PCR

Reaksi PCR dilakukan menggunakan primer *outer* dari LAMP seperti yang dilakukan oleh Fernandez-Soto *et al.* (2014). Variasi suhu penempelan primer pada 51-59°C menunjukkan hanya terdapat larik tunggal berukuran 229 bp (Gambar 3). Reaksi PCR yang dilakukan dalam deteksi *Vibrio harveyi* selanjutnya akan dilakukan dengan suhu penempelan primer 59°C. Hal ini dilakukan untuk mencegah terjadinya reaksi silang antar primer dengan DNA dari bakteri yang berbeda jauh.



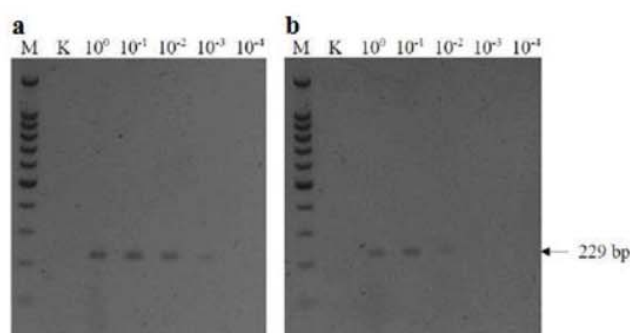
Gambar 3. Optimasi suhu penempelan primer. M adalah *ladder* 100 bp. Suhu dalam Celcius.

Pengujian terhadap pembentukan reaksi silang dilakukan dengan 2 bakteri lain yakni *Vibrio cholerae* dan *Escherichia coli*. Primer *outer* yang didesain tidak menunjukkan adanya reaksi silang dengan kedua bakteri tersebut (Gambar 4). Hal ini menandakan bahwa primer tersebut spesifik dan dapat digunakan untuk deteksi *Vibrio harveyi*. Hal ini dikarenakan gen *toxR* hanya dimiliki kelompok *Vibrionaceae* serta memiliki diversitas yang tinggi (Conejero & Hedreyda, 2003). Diversitas yang tinggi pada gen *toxR* menyebabkan terdapat variasi yang cukup besar antar spesies *Vibrio* tetapi memiliki kemiripan yang cukup tinggi dalam satu spesies sehingga dapat digunakan untuk identifikasi bakteri *Vibrio* (Pascual, Macian, Arahal, Garay, & Pujalte, 2010).



Gambar 4. Pengujian spesifisitas primer pada *Escherichia coli* (*Ec*), *Vibrio cholerae* (*Vc*) dan *Vibrio harveyi* (*Vh*). M adalah ladder 100 bp dan K adalah kontrol.

Batas deteksi diukur menggunakan DNA dengan 2 metode ekstraksi yang berbeda pada berbagai tingkat pengenceran 10 kali. Produk amplifikasi berukuran 229 bp dapat teramati hingga tingkat pengenceran 10^3 menggunakan DNA yang diekstraksi dengan *thermal lysis* juga 10^2 menggunakan DNA yang diekstraksi dengan Chen & Kuo (Gambar 5). Berdasarkan kadar DNA yang diekstraksi, DNA yang diperoleh dengan *thermal lysis* dapat terdeteksi hingga $0,526 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ sementara DNA yang diperoleh dengan metode Chen & Kuo dapat terdeteksi hingga $2,605 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$. Hal ini dikarenakan tidak ada DNA yang terbuang akibat proses pengendapan alkohol yang dilakukan pada metode Chen & Kuo sehingga memiliki rendemen yang lebih tinggi. Penelitian serupa untuk mendeteksi *Loa loa* menggunakan PCR juga mendapatkan batas deteksi hingga 0,5 ng tiap reaksinya (Fernandez-Soto *et al.*, 2014). Apabila ditentukan berdasarkan jumlah bakteri yang digunakan, primer ini dapat mendeteksi hingga $2,09 \times 10^6 \text{ CFU.mL}^{-1}$.



Gambar 5. Batas deteksi *Vibrio harveyi* dengan metode ekstraksi DNA thermal lysis (a) dan Chen & Kuo (b). M adalah ladder 100 bp dan K adalah kontrol.

Primer yang digunakan dalam penelitian ini secara umum masih tidak cukup sensitif. Hal ini dikarenakan batas deteksi dari sebagian besar galur *Vibrio harveyi* (Saulnier, Haffner, Goarant, Levy & Ansquer, 2000). Akan tetapi walaupun primer yang digunakan dalam penelitian ini kurang sensitif dibandingkan penelitian lain yang dapat mendeteksi hingga $4.000 \text{ sel.mL}^{-1}$, namun primer ini telah dibuktikan dapat digunakan untuk deteksi DNA yang diekstraksi dengan *thermal lysis* (Pang *et al.*, 2006). Primer ini juga cenderung lebih spesifik dan lebih sensitif dibandingkan penggunaan primer yang berbasis 16S rDNA untuk deteksi *Vibrio harveyi* (Oakey, Levy, Bourne, Cullen, & Thomas, 2003).

SIMPULAN

Desain primer LAMP untuk deteksi *Vibrio harveyi* dengan daerah kosong sebesar 47 bp untuk penempelan primer *stem* serta 28 dan 26 bp untuk penempelan primer *loop* telah berhasil dibuat. Akan tetapi, primer tersebut tidak dapat digunakan untuk deteksi LAMP karena terjadi *false positive*. Sementara itu, primer *outer* (F3 & B3) dapat digunakan untuk deteksi *Vibrio harveyi* secara spesifik hingga 0,526 ng.µL⁻¹.

Primer *outer* yang didesain dalam penelitian ini masih dapat dikembangkan lebih lanjut dengan meningkatkan sensitivitas serta menguji spesifisitas terhadap beberapa galur *Vibrio harveyi* dan pengujian reaksi silang dengan *Vibrio* lainnya. Sementara itu, primer LAMP dapat diuji ulang untuk memastikan keberadaan *false positive* disebabkan oleh dimer primer atau pembentukan struktur sekunder dan bukan dikarenakan terjadi kontaminasi.

PUSTAKA ACUAN

- Austin, B, 2010, '*Vibrios* as casual agents of zoonoses', *Veterinary Microbiology*, 140(3-4), 310-317.
- Austin, B, & Zhang, XH, 2006, '*Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates', *Letters in Applied Microbiology*, 43(2), 119-124.
- Cao, YT, Wu, ZH, Jian, JC, & Lu, YS, 2010, 'Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for the rapid detection of *Vibrio harveyi* in cultured marine shellfish', *Letters in Applied Microbiology*, 51(1), 24-29.
- Chen, WP, & Kuo, TT, 1993, 'A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA', *Nucleic Acid Research*, 21(9), 2260.
- Conejero, MJ, & Hedreyda, CT, 2003, 'Isolation of partial *toxR* gene of *Vibrio harveyi* and design of *toxR*-targeted PCR primers for species detection'. *Journal of Applied Microbiology*, 95(3), 602-611.
- Dhama, K, Karthik, K, Chakraborty, S, Tiwari, R, Kapoor, S, Kumar, A, & Thomas, P, 2014, 'Loop-mediated Isothermal Amplification of DNA (LAMP): A new diagnostic tool lights the world of diagnosis of animal and human pathogens: A review', *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 17(2), 151-166.
- Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya, n.d., '*Udang Vaname dan Udang Windu Masih Andalan Ekspor Indonesia*', Retrieved Juni 15, 2018, from Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya: http://www.djpb.kkp.go.id/arsip/c/246/Udang-Vannamei-dan-Udang-Windu-Masih-AndalanEkspor-Indonesia/?category_id=13
- Felix, F, Nugroho, TT., Silalahi, S, & Octavia, Y, 2011, 'Skrining bakteri *Vibrio* sp. asli Indonesia sebagai penyebab penyakit udang berbasis teknik 16S ribosomal DNA', *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*, 3(2), 85-99.
- Fernandez-Soto, P, Mvoulouga, PO, Akue, JP., Aban, JL, Santiago, BV., Sanchez, MC., & Muro, A, 2014, 'Development of a highly sensitive Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Method for the Detection of *Loa loa*', *PLOS One*, 9(4), e94664.
- Gandelman, O, Jackson, R, Kiddle, G, & Tisi, L, 2011, 'Loop-Mediated Amplification accelerated by stem primers', *International Journal of Molecular Sciences*, 12(12), 9108-9124.
- Garno, YS, 2004, 'Pengembangan budidaya udang dan pencemarannya pada perairan pesisir', *Jurnal Teknologi Lingkungan*, 5(3), 187-192.
- Hsieh, K, Mage, PL, Csordas, AT, Eisenstein, M, & Soh, HT, 2014, 'Simultaneous elimination of carryover contamination and detection of DNA with uracil-DNA-glycosylase-supplemented loop-mediated isothermal amplification (UDG-LAMP)', *Chemical Communications*, 50(28), 3747-3749.
- Hundenborn, J, Thurig, S, Kommerell, M, Haag, H, & Nolte, O, 2013, 'Severe wound infection with *Photobacterium damsela* ssp. *damsela* and *Vibrio harveyi*, following a laceration injury in marine environment: A case report and review of the literature', *Case Reports*

- in Medicine*, 2013, 1-7. 13
- Liu, PC, Lee, KK, & Chen, SN, 1996, Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn, *Penaeus monodon*, *Letters in Applied Microbiology*, 22(6), 413-416.
- Meagher, RJ, Priye, A, Light, YK, Huang, C, & Wang, E, 2018, Impact of primer dimers and self-amplifying hairpins on reverse transcription loop-mediated isothermal amplification detection of viral RNA', *Analyst*, 143(8), 1924-1933.
- Nagamine, K, Hase, T, & Notomi, T, 2002, 'Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers', *Molecular and Cellular Probes*, 16(3), 223-229. 3
- Notomi, T, Okayama, H, Masubuchi, H, Yonekawa, T, Watanabe, K, Amino, N, & Hase, T, 2000, 'Loop-mediated isothermal amplification of DNA', *Nucleic Acids Research*, 28(12), e63. 36
- Oakey, HJ, Levy, N, Bourne, DG, Cullen, B, & Thomas, A, 2003, 'The use of PCR to aid in the rapid identification of *Vibrio harveyi* isolates', *Journal of Applied Microbiology*, 95(6), 1293-1303. 9
- Pang, L, Zhang, XH., Zhong, Y, Chen, J, Li, Y, & Austin, B, 2006, 'Identification of *vibrio harveyi* using PCR amplification of the *toxR* gene', *Letters in Applied Microbiology*, 43(3), 249-255.
- Pascual, J, Macian, MC, Arahal, DR, Garay, E, & Pujalte, MJ, 2010, 'Multilocus sequence analysis of central clade of the genus *Vibrio* by using the 16S rRNA, *recA*, *pyrH*, *rpoD*, *gyrB*, *rctB* and *toxR* genes', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 154-165. 1
- Robertson, PA, Calderon, J, Carrera, L, Stark, JR Zherdmant, M, & Austin, B, 1998, 'Experimental *Vibrio harveyi* infections in *Penaeus vannamei* larvae', *Diseases of Aquatic Organisms*, 32, 151-155. 7
- Saulnier, D, Haffner, P, Goarant, C, Levy, P, & Ansquer, D, 2000, 'Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: A review', *Aquaculture*, 191(1-3), 133-144.
- Wang, D-G, Brewster, JD, Paul, M, & Tomasula, PM, 2015, 'Two methods for increased specificity and sensitivity in Loop-Mediated Isothermal Amplification', *Molecules*, 20(4), 6048-6059.

ORIGINALITY REPORT

13%

SIMILARITY INDEX

11%

INTERNET SOURCES

7%

PUBLICATIONS

4%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

- 1** aei.pitt.edu
Internet Source 1%
- 2** scialert.net
Internet Source 1%
- 3** Tianyan Song, Claudia Toma, Noboru Nakasone, Masaaki Iwanaga. " Sensitive and rapid detection of and enteroinvasive by a loop-mediated isothermal amplification method ", FEMS Microbiology Letters, 2005
Publication 1%
- 4** Submitted to University of Technology, Sydney
Student Paper 1%
- 5** Submitted to Unviersidad de Granada
Student Paper 1%
- 6** D. Castro. "Vibrios isolated from the cultured manila clam (Ruditapes philippinarum): numerical taxonomy and antibacterial activities", Journal of Applied Microbiology, 9/2002
Publication 1%

7	aquaticcommons.org Internet Source	1 %
8	docsplayer.com Internet Source	1 %
9	fas.biomedcentral.com Internet Source	1 %
10	repository.unair.ac.id Internet Source	1 %
11	www.longdom.org Internet Source	1 %
12	Submitted to Georgia State University Student Paper	1 %
13	www1.vnua.edu.vn Internet Source	1 %
14	pubs.rsc.org Internet Source	<1 %
15	china.iopscience.iop.org Internet Source	<1 %
16	blog.ub.ac.id Internet Source	<1 %
17	www.cheric.org Internet Source	<1 %
18	www.ejournal.undip.ac.id Internet Source	<1 %

19	zenodo.org Internet Source	<1 %
20	Christina L. Salaki, Langkah Sembiring. "APLIKASI METODE ARDRA DALAM IDENTIFIKASI ISOLAT <i>Bacillus thuringiensis</i> ENDOGENIK SEBAGAI PENGENDALI HAMA KUBIS (<i>Crocidolomia binotalis</i>)", EUGENIA, 2011 Publication	<1 %
21	scindeks.ceon.rs Internet Source	<1 %
22	jkptb.ub.ac.id Internet Source	<1 %
23	himatekla.wordpress.com Internet Source	<1 %
24	conexoes.fef.unicamp.br Internet Source	<1 %
25	www.bkipm.kkp.go.id Internet Source	<1 %
26	www.essays.se Internet Source	<1 %
27	www.pubmedcentral.nih.gov Internet Source	<1 %
28	H. Dhanze, K. N. Bhilegaonkar, G. V. P. P. S. Ravi Kumar, P. Thomas et al. "Comparative	<1 %

evaluation of nucleic acid-based assays for detection of Japanese encephalitis virus in swine blood samples", Archives of Virology, 2015

Publication

29

Sri Wening, Agus Eko Prasetyo, Tjut Ahmad Perdana Rozziansha, Agus Susanto.

"OPTIMIZATION OF DNA EXTRACTION PROTOCOL OF *Elaeidobius kamerunicus*", Jurnal Penelitian Kelapa Sawit, 2016

Publication

<1 %

30

ar.scribd.com

Internet Source

<1 %

31

docplayer.info

Internet Source

<1 %

32

doczz.fr

Internet Source

<1 %

33

repository.unand.ac.id

Internet Source

<1 %

34

www.repository.trisakti.ac.id

Internet Source

<1 %

35

zombiedoc.com

Internet Source

<1 %

36

Anix Vivek Santhya, Rosalind George Mulloorpeedikayil, Riji John Kollanoor, Prince M.J. Jeyaseelan. "Molecular variations in *Vibrio*

<1 %

alginolyticus and V. harveyi in shrimp-farming systems upon stress", Brazilian Journal of Microbiology, 2015

Publication

Exclude quotes Off

Exclude matches < 4 words

Exclude bibliography On

2775-Article_Text-6300-1-10-20200324.pdf

GRADEMARK REPORT

FINAL GRADE

/0

GENERAL COMMENTS

Instructor

PAGE 1

PAGE 2

PAGE 3

PAGE 4

PAGE 5

PAGE 6

PAGE 7

PAGE 8

PAGE 9
