

Komparasi Metode Isolasi DNA dalam Mendeteksi Gen *toxR* Bakteri *Vibrio parahaemolyticus* pada Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*)

Nana Lestari^{1*}

¹Balai Besar Perikanan Budidaya Laut Lampung, Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya
Kabupaten Pesawaran, Bandar Lampung, Indonesia

*nanalestariwinata@gmail.com

Diterima: 25 Januari 2024 | Disetujui: 29 Februari 2024

ABSTRAK

Bakteri *Vibrio parahaemolyticus* merupakan salah satu patogen berbahaya pada budidaya udang vaname (*Litopenaeus vannamei*). Infeksi bakteri ini dapat menyebabkan kematian masal pada udang dan kerugian yang cukup besar bagi pembudidaya. Bakteri ini juga memiliki gen spesifik, yaitu gen *toxR* yang dipakai untuk mendeteksi keberadaannya. Keberhasilan deteksi bakteri ini menentukan kesuksesan penanganan penyakit yang ditimbulkannya. Tujuan penelitian untuk mengetahui metode isolasi DNA yang optimal dalam mendeteksi gen *toxR* bakteri *Vibrio parahaemolyticus* pada udang vaname. Penelitian dilakukan dengan cara identifikasi berbasis biologi molekuler yang menggunakan dua protokol isolasi DNA yaitu *Chloroform* dan *Boilling Lysis Buffer*. Hasil visualisasi menunjukkan bahwa DNA gen *toxR* muncul pada sampel yang diisolasi dengan *Boilling Lysis Buffer* pada preparasi kultur media *Tryptic Soy Broth* (TSB). Hal ini memberikan arti bahwa metode *Boilling Lysis Buffer* merupakan metode isolasi DNA yang sesuai untuk mendeteksi gen *toxR* bakteri *Vibrio parahaemolyticus* pada udang vaname.

Kata Kunci: identifikasi, patogen, protokol

Comparison of DNA Isolation Methods in Detecting the *toxR* Gene of *Vibrio parahaemolyticus* Bacteria in Vaname Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

ABSTRACT

Vibrio parahaemolyticus bacteria is one of the dangerous pathogens in vaname shrimp farming (*Litopenaeus vannamei*). Infection with this bacterium can cause mass mortality in shrimp and considerable losses for farmers. This bacterium also has a specific gene, the *toxR* gene, which is used to detect its presence. The successful detection of this bacterium determines the success of handling the disease it causes. The purpose of the study was to determine the optimal DNA isolation method in detecting the *toxR* gene of *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in vaname shrimp. The research was conducted by means of molecular biology-based identification using two DNA isolation protocols, namely *Chloroform* and *Boilling Lysis Buffer*. Visualization results showed that *toxR* gene DNA appeared in samples isolated with *Boilling Lysis Buffer* in *Tryptic Soy Broth* (TSB) media culture preparation. This means that the *Boilling Lysis Buffer* method is a suitable

DNA isolation method for detecting the toxR gene of the Vibrio parahaemolyticus bacteria in white shrimp.

Keywords: identification, pathogens, protocol

PENDAHULUAN

Udang merupakan hasil perikanan yang paling populer dalam bidang akuakultur di seluruh dunia. Berdasarkan data dari Direktorat Jenderal Penguatan Daya Saing Produk Kelautan dan Perikanan pada Kementerian Kelautan dan Perikanan tahun 2022, udang menduduki urutan pertama untuk nilai komoditas ekspor hasil perikanan tahun 2021. Komoditas akuakultur udang putih atau udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) merupakan satu spesies udang yang banyak dibudidayakan oleh masyarakat. Budi daya perairan ini tentu memiliki tantangan dan risiko yang cukup tinggi, salah satu di antaranya potensi adanya infeksi penyakit yang berasal dari bakteri, terutama yang disebabkan oleh bakteri *Vibrio* sp.

Vibrio adalah salah satu jenis bakteri perairan atau akuatik yang dapat ditemukan mulai dari perairan umum seperti air kolam, sungai yang mengalir, hingga perairan laut yang airnya berasa asin. Spesies bakteri *Vibrio* juga dapat menginfeksi dan menyebabkan penyakit berbahaya pada kesehatan masyarakat seperti pada *V. parahaemolyticus*. Bakteri ini memiliki morfologi batang bengkok, Gram negatif, bersifat fakultatif anerob atau tidak membutuhkan oksigen untuk tumbuh, bersifat halofilik, dan dapat menjadi patogen pada manusia (Wong *et al.*, 1999; Wong, 2003; Nair *et al.*, 2007; Sujeewa *et al.*, 2009). *V. parahaemolyticus* dapat tumbuh secara optimum pada suhu 35⁰-43⁰C, pH 4,8-11, dan kadar NaCl 3% (Bonang, 1979).

Negara tropis seperti Indonesia merupakan episentrum penyebaran penyakit infeksi bakteri *V. parahaemolyticus* (Nair *et al.*, 2007). Pertumbuhan populasi *V. parahaemolyticus* dapat meningkatkan infeksi penyakit vibriosis pada komoditas akuakultur udang vaname (Lightner *et al.*, 1996). Kemampuan infeksius *V. parahaemolyticus* tidak hanya sebatas pada tingginya mortalitas udang, namun juga berpotensi menjadi tidak berkelanjutannya bisnis akuakultur komoditas udang vaname. Anggota famili Vibrionaceae seperti *V. parahaemolyticus* memiliki bagian genom spesifik yaitu gen *toxR*. Gen *toxR* tidak menjadi target ekspresi yang menyebabkan penyakit infeksi pada masyarakat melainkan gen *toxR* berperan sebagai pengatur (regulator) aktivasi gen-gen lain seperti gen spesifik penyebab patogen *thermostable direct hemolysin* (*tdh*) dan *thermostable related hemolysin* (*trh*), agar memproduksi racun (toksin) misalnya hemolisin pada proses regulasi gen lengkap (Yuherman, 2000; Rinanda, 2008; Marlina & Lola, 2015). Banyaknya populasi bakteri *V. parahaemolyticus* tidak berhubungan dengan tingkat keganasan, melainkan berhubungan dengan banyaknya racun yang terekspresi gen-gen pemicu hemolisin (Wong, 2003; Sujeewa *et al.*, 2009).

Molekul asam nukleat seperti DNA yang telah diperoleh dalam bentuk genomik dapat dimanfaatkan untuk kepentingan yang bervariasi antara lain: penggandaan gen target (amplifikasi) dan dilanjutkan dengan identifikasi melalui teknik elektroforesis. Genom DNA diperoleh dengan cara mengeluarkan DNA dari struktur dinding sel menggunakan bahan kimia perusak dinding sel. Genomik DNA diisolasi lebih lanjut dengan membersihkannya dari material organik seperti asam amino untai ganda, asam lemak berganda, dan karbohidrat. Intisari jalur proses genomik DNA yaitu proses lisis, mengumpulkan bahan aktif (ekstrak) asam nukleat DNA dan purifikasinya. Genom DNA yang murni akan memengaruhi proses hasil selama menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Corkill & Rapley, 2008; Dolphin, 2008).

Dasar genomik DNA diberbagai jenis sel atau jaringan organisme relatif sama, selain itu terdapat tambahan bahan dan teknik tertentu yang memberikan keunggulan dan kemudahan dalam aplikasinya. Sebagian teknik akan semakin mudah dengan mengaplikasikan *kit* hasil produk entitas merek spesifik. Kit isolasi DNA merupakan seperangkat alat dan bahan untuk melakukan isolasi DNA yang telah dikemas dan disertai dengan prosedur penggunaannya. Setiap tahapan isolasi DNA menggunakan tata cara yang diselaraskan dengan kebutuhan. Isolasi DNA yang menggunakan *kit* dan konvensional masing-masing memiliki kelebihan dan kelemahan. Kebaikan dari isolasi metode konvensional atau tanpa *kit* adalah biaya yang lebih rendah dan umum dipergunakan, namun kelemahannya adalah

membutuhkan waktu cukup panjang dan hasil yang didapat bergantung dari karakter dan jenis sampel (Sari *et al.*, 2014). Surzycki (2000) menjelaskan faktor penting dari isolasi DNA yang harus diawasi adalah DNA yang dihasilkan tidak terkontaminasi asam amino dan RNA, metode isolasi mudah dan dapat digunakan untuk sampel makhluk hidup, serta metode isolasi diharapkan dapat berhasil mempertahankan struktur dan fungsi DNA, juga sederhana dan cepat.

Kajian mendalam tentang gen *toxR* menunjukkan bahwa gen ini menjadi indikator keberadaan bakteri *V. parahaemolyticus* dengan tingkat kesamaan mendekati sempurna 99%, sehingga dapat digunakan dalam upaya memitigasi risiko infeksi *V. parahaemolyticus*. Isolasi DNA *V. parahaemolyticus* merupakan salah satu langkah yang sangat diperlukan dalam pengujian gen *toxR* bakteri ini. Metode isolasi DNA yang benar dan akurat sangat penting untuk menentukan keberhasilan identifikasi gen *toxR* yang menjadi tujuan deteksi keberadaan bakteri *V. parahaemolyticus* pada sampel udang. Tujuan penelitian untuk mengetahui metode isolasi DNA yang optimal dalam mendeteksi gen *toxR* bakteri *Vibrio parahaemolyticus* pada udang vaname.

METODE PENELITIAN

Waktu, Tempat, dan Metode

Penelitian dilaksanakan pada bulan Oktober 2023 dengan lokasi di Laboratorium Balai Besar Perikanan Budidaya Laut Lampung, Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya, Bandar Lampung. Penelitian dilakukan dengan cara identifikasi berbasis biologi molekuler menggunakan dua protokol isolasi DNA yaitu *Chloroform* dan *Boiling Lysis Buffer*. Penggunaan kedua metode ini karena banyak dan seringkali dipakai dalam ekstraksi DNA bakteri.

Sampel dan Analisis Data

Sampel yang digunakan berupa hepatopankreas udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) yang telah dihomogenkan, selanjutnya dibagi menjadi 6 (enam) bagian dengan rincian sebagai berikut. Dua sampel dimasukkan ke *tube* 1,5 ml dan disimpan di *chiller*. Dua sampel dimasukkan ke *tube* berisi ethanol, terakhir dua sampel dikultur pada media TSB 2% dan diinkubasi selama 24 jam. Setelah 24 jam, sampel diisolasi dengan dua metode berbeda, yaitu enam sampel diisolasi dengan *Chloroform* dan enam sampel diisolasi dengan metode *Boiling Lysis Buffer*.

A. Isolasi DNA dengan metode *Chloroform*

Isolasi sampel dengan *chloroform* diawali dengan menginkubasi sampel di suhu 75°C selama 5 menit. Ditambahkan 0,7ml *chloroform*, vortex 20 s, dan disentrifus 12.000 g dengan waktu 5 menit. Sebanyak 200µl supernatan dipindahkan ke *tube* yang baru, ditambahkan 100µl CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*) dan 900µl ddH₂O. Inkubasi dilakukan pada suhu 75°C selama 5 menit kemudian disentrifus 12000 g selama 10 menit. Supernatan dibuang, dicampurkan pellet 150µl *dissolving solution*, lalu diinkubasi pada suhu 75°C selama 5 menit. Sampel disentrifus selama 5 menit, dipindahkan supernatan ke *tube* baru, lalu ditambahkan 300µl ethanol 95%. Sampel divortex, lalu disentrifus selama 5 menit selanjutnya dibuang supernatannya. Pellet dicuci dengan 200µl ethanol 75% dan *dispindown*. Supernatan dibuang dan dikeringkan pelletnya, lalu terakhir ditambahkan 30µl TE *buffer*.

B. Isolasi DNA dengan metode *Boiling Lysis Buffer*

Isolasi DNA menggunakan metode *Boiling Lysis Buffer* dimulai dengan menambahkan 500µl lysis *buffer* pada sampel, lalu diinkubasi di suhu 95°C selama 10 menit. Sampel disentrifus 12.000 g selama 10 menit. Supernatan dipindahkan 200µl ke *tube* yang baru lalu ditambah dengan 400µl ethanol 95%. Dilakukan vortex dan sentrifuge 12.000 g selama 5 menit. Etanol dikeluarkan lalu dikeringkan/balik *tube* selama 10 menit. Selanjutnya ditambahkan 30µl TE *buffer* lalu divortex.

C. Penghitungan konsentrasi genom DNA

Penghitungan konsentrasi DNA hasil isolasi dikerjakan dengan alat Nannodrop. Hasil isolasi DNA akan diukur pada panjang gelombang (λ) 260 dan protein panjang gelombang 280. Pengukuran ini dapat memperlihatkan absorbansi dan konsentrasi, serta kemurnian DNA nya.

D. Amplifikasi

Menurut Kim *et al.* (1999), primer spesifik gen *toxR* yang digunakan saat amplifikasi yaitu Prime5' - ATA CGA GTG GTT GCT GTC ATG-3' dan 5' -GTC TTC TGA CGC AAT CGT TG-3'. Prime pada *band* atau pita 368 bp. Reaksi PCR menggunakan campuran reaktan atau *mastermix* yang mengandung 1 primer *forward*, *reverse*, MyTaq HS Red Mix, dan *grade water*. Dasar PCR yang dipakai yaitu pre-denaturasi (94°C, 10 menit), denaturasi (94°C, 1 menit), annealing (65°C, 1,5 menit), ekstensi (72 °C, 1,5 menit) dengan 20 kali siklus dan final extention (72°C, 10 menit) (Kim *et al.*, 1999). Sebanyak 8-10 mikroliter hasil amplifikasi akan dielektroforesis pada agarosa 2% serta *buffer* TAE 10% dengan voltase 100 V dengan waktu jalan alat 27 menit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

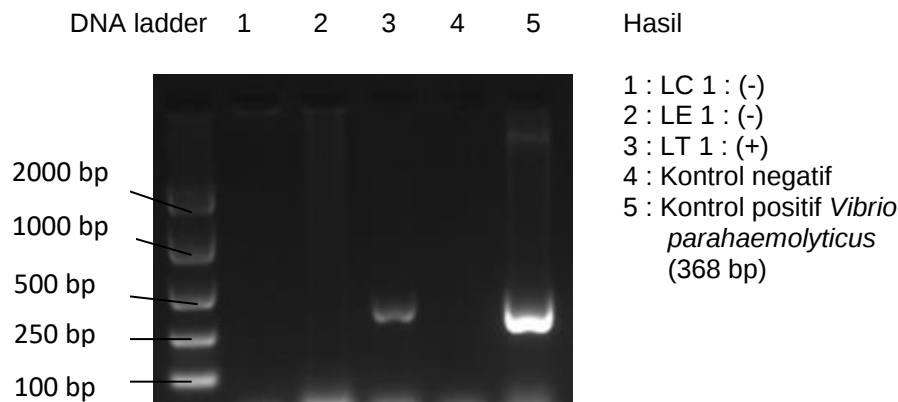
Penelitian ini menggunakan sampel dengan tiga perlakuan, yaitu disimpan di *chiller*, fiksasi ethanol, dan kultur di media TSB. Setelah 24 jam sampel diisolasi dengan dua metode yaitu *Chloroform* dan *Boilling Lysis Buffer*. Kemudian dilakukan pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA dengan NannoDrop 2000 sehingga diperoleh sesuai Tabel 1.

Tabel 1. Konsentrasi dan Purifikasi (Kemurnian) Genom DNA

No.	Kode Sampel	Teknik Isolasi DNA	Panjang Gelombang 260nm	Panjang Gelombang 280nm	Purifikasi DNA	Konsentrasi DNA
1.	CC 1	<i>Chloroform</i>	1.114	0.726	1.54	55.7
2.	CC 2	<i>Chloroform</i>	0.199	0.133	1.49	9.9
3.	CE 1	<i>Chloroform</i>	12.519	6.405	1.95	626.0
4.	CE 2	<i>Chloroform</i>	23.071	11.769	1.96	1153.5
5.	CT 1	<i>Chloroform</i>	0.170	0.087	1.96	8.5
6.	CT 2	<i>Chloroform</i>	0.164	0.085	1.92	7.9
7.	LC 1	<i>Lysis Buffer</i>	14.490	10.676	1.36	724.5
8.	LC 2	<i>Lysis Buffer</i>	16.416	12.320	1.33	820.8
9.	LE 1	<i>Lysis Buffer</i>	49.923	27.692	1.80	2496.1
10.	LE 2	<i>Lysis Buffer</i>	59.625	32.784	1.82	2981.3
11.	LT 1	<i>Lysis Buffer</i>	28.256	16.716	1.69	1412.8
12.	LT 2	<i>Lysis Buffer</i>	22.345	13.173	1.70	1117.3

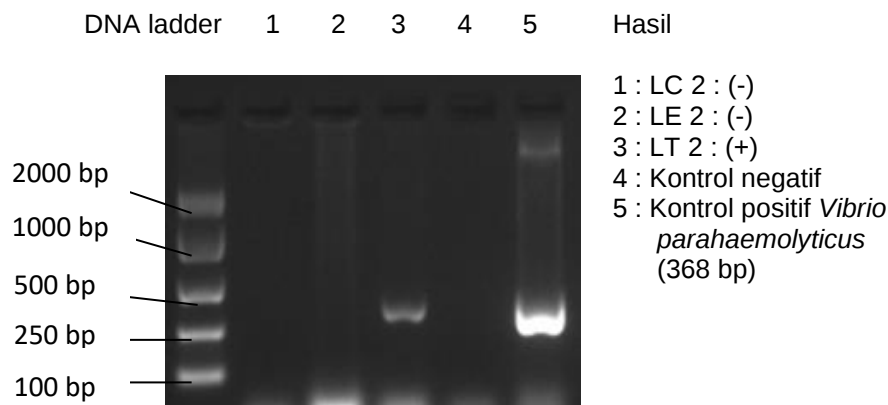
Berdasarkan hasil ekstraksi DNA dengan metode *Chloroform* dan *Boilling Lysis Buffer* diperoleh kemurnian genom DNA paling rendah pada metode *Chloroform* dengan kode sampel CC 2 yaitu sampel preparasi yang disimpan pada *chiller* (Tabel 1). Menurut Ethica *et al.* (2013), konsentrasi genom DNA yang lebih kecil menunjukkan asam nukleat DNA memiliki pengotor lain dari material protein dan RNA. Pada saat isolasi, RNA dan protein yang merupakan kontaminan terdapat dalam ekstrak sampel. Adapun untuk konsentrasi DNA tertinggi didapatkan dari metode *Boilling Lysis Buffer* dengan kode sampel LE 2 yaitu sampel preparasi penambahan ethanol. Nilai purifikasi DNA dihasilkan dari rasio absorbansi A260/280 yang terdapat pada DNA. Nilai panjang gelombang 260nm adalah nilai optimal

DNA ketika menerima ultraviolet dengan fungsi untuk memproyeksikan konsentrasi DNA. Nilai absorbansi 280nm adalah nilai optimal residu protein yang dapat menyimpan cahaya masuk (Sambrook, 1989) (Tabel 1).



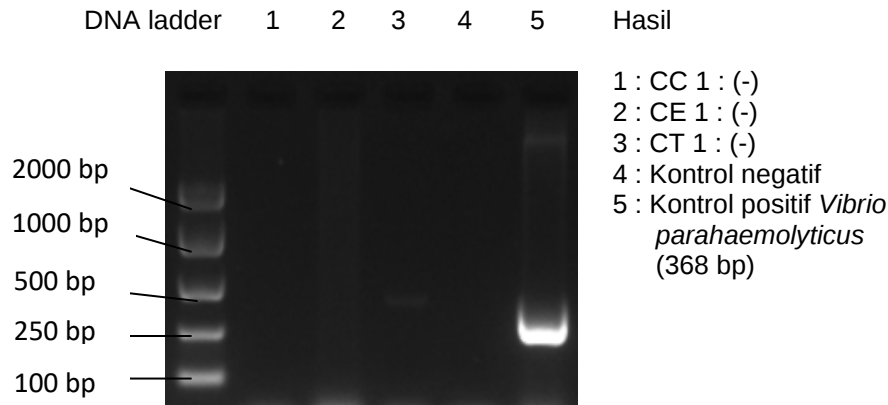
Gambar 1. Visualisasi elektroforesis DNA dengan metode *Boilling Lysis Buffer* untuk ulangan 1

Sampel DNA yang telah diamplifikasi, divisualisasi dengan elektroforesis pada agarose 2%. Visualisasi agarose menggunakan *Gel Documentation System* seperti terlihat pada Gambar 1 dan 2. Hasil visualisasi memperlihatkan DNA gen *toxR* muncul pada sampel yang diisolasi dengan *Boilling Lysis Buffer* pada preparasi kultur TSB. Visualisasi tersebut menghasilkan pita yang terlihat jelas dan tebal. Sampel yang dipreparasi pada kultur TSB memiliki sensitivitas gen *toxR* sehingga gen *toxR* dapat terlihat pada visualisasi. Teknik preparasi ini memberikan persentasi *Vibrio parahaemolyticus* yang paling tinggi sebab diasumsikan masa pengkayaan adalah masa pemulihan (*recovery*) dengan keadaan bakteri pada kondisi sakit. Selain itu, pita pada sampel terletak pada ± 368 bp, yang menandakan bahwa DNA yang muncul merupakan DNA gen *toxR* *Vibrio parahaemolyticus* (Gambar 1 dan 2).



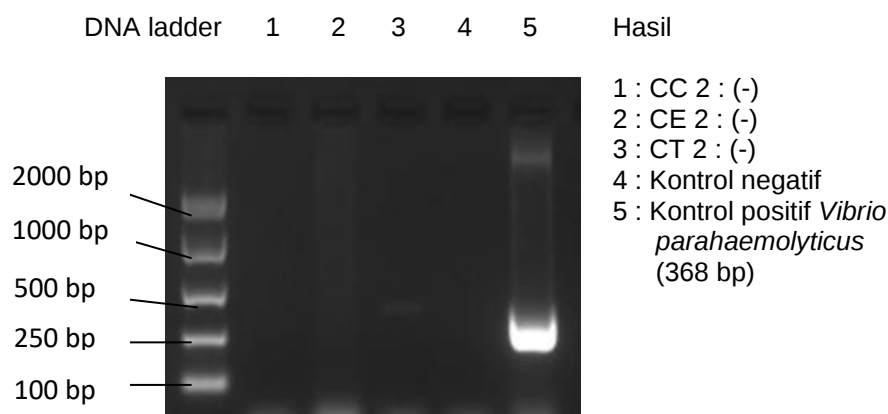
Gambar 2. Visualisasi elektroforesis DNA dengan metode *Boilling Lysis Buffer* untuk ulangan 2

Pita DNA hasil visualisasi yang semakin tebal tidak berarti sejalan dengan tingginya konsentrasi DNA (Sambrook, 1989), jika merujuk dari konsentrasi DNA pada kode sampel LT 1 dan LT 2 bukan merupakan konsentrasi tertinggi pada pengukuran konsentrasi DNA (Tabel 1). Hasil visualisasi pada isolasi dengan *Chloroform* juga menghasilkan pita, namun pita terlihat tipis serta berada pada sekitar 500 bp jika ditarik garis lurus dengan DNA *Ladder*. Pita pada kontrol positif terlihat sangat tebal dan lebih rendah dari letak seharusnya, yaitu 368 bp (Gambar 3 dan 4). Hal ini terjadi karena konsentrasi DNA kontrol positif sangat tinggi, dan nilai konsentrasi berpengaruh terhadap intensitas pita DNA yang dihasilkan. Menurut Utami *et al.* (2012), mutu DNA yang baik dapat dilihat dari konsentrasi DNA yang tinggi dan ditandai dengan tingginya intensitas pita DNA yang terlihat pada hasil visualisasi.



Gambar 3. Visualisasi elektroforesis DNA dengan metode *Chloroform* untuk ulangan 1

Perbedaan konsentrasi DNA pada setiap metode dipengaruhi oleh cara penggunaan bahan fisik yang diberikan dan kapasitas *buffer* yang digunakan pada proses isolasi untuk merusak sel. Konsentrasi DNA yang diperoleh dari proses isolasi dipengaruhi oleh jenis *buffer* yang digunakan (Mulyani *et al.*, 2003). Ekstraksi DNA dengan menggunakan metode *Chloroform* mengaplikasikan senyawa CTAB yang dikenal sebagai jenis surfaktan kationik, untuk menghancurkan material sel tanaman. Menurut Suprpto (2003), senyawa CTAB, dominan diaplikasikan untuk ekstraksi DNA pada tanaman yang banyak mengandung polisakarida dan senyawa *polyphenol*. Hal inilah yang menjadikan prediksi kuat bahwa akibatnya dari proses isolasi DNA pada sampel kurang maksimal karena sampel yang digunakan udang vaname dengan target bakteri *Vibrio parahaemolyticus* (Gambar 3 dan 4).



Gambar 4. Visualisasi elektroforesis DNA dengan metode *Chloroform* untuk ulangan 2

KESIMPULAN

Visualisasi elektroforesis menunjukkan bahwa untuk isolasi DNA dengan target pengujian gen *toxR* pada udang vaname yang terbaik adalah menggunakan metode *Boiling Lysis Buffer*. Waktu isolasi yang diperlukan ± 35 menit tergantung banyaknya sampel, dan penggunaan bahan yang lebih sedikit jika dibandingkan dengan metode *Chloroform*. Visualisasi juga menunjukkan hasil yang baik ditandai dengan adanya pita yang tebal dan jelas.

DAFTAR PUSTAKA

- Bonang, G., & Koeswardono, E.S. (1979). *Mikrobiologi kedokteran untuk laboratorium dan klinik*. Jakarta: Gramedia.
- Corkill, G., & Rapley, R. (2008). *The manipulation of nucleic acid: Basic tools & techniques in molecular biotechnology handbook*. Ed ke-2. New York (US): Humana Press.

- Direktorat Jenderal Penguatan Daya Saing Produk Kelautan dan Perikanan Direktorat Jenderal Penguatan Daya Saing Produk Kelautan dan Perikanan. (2022). *Statistik ekspor hasil perikanan tahun 2017-2021*. Jakarta: Kementerian Kelautan dan Perikanan.
- Dolphin, W. D. (2008). *Biological investigations*. New York: The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Ethica, S.M., Nataningtyas, D.R., Lestari, P., Istini, Semiarti, E., Widada, J., & Raharjo, T.J. (2013). Comparative evaluation of conventional versus rapid methods for amplifiable genomic DNA isolation of cultured *Azospirillum* sp. JG. 3. *Indo. J. Chem*, 13, 248-253.
- Kim, Y.B., Jun, O., Chiho, M., Naoki, T., Satoru, H., & Mitsuaki, N. (1999). Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* Gene. *Journal Of Clinical Microbiology*, 37(4), 1173-1177.
- Lightner, D.V. (1996). *A handbook of shrimp pathonology and diagnostic procedures for diaseses of cultured penaeid Shrimp*. Baton Rouge, Louisiana: The World Aquaculture Society.
- Marlina & Lola, A. (2015). Deteksi gen virulen bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dari sampel pensi (*Corbicula moltkiana*. Prime) dengan metoda *Polymerase Chain Reaction* (PCR). *Jurnal Scientia*, 5(1), 42-46.
- Mulyani, Y., Purwanto, A., & Nurruhwati, I. (2003). *Perbandingan beberapa metode isolasi DNA untuk deteksi dini Koi Herpes Virus (KHV) pada ikan mas (Cyprinus carpio L)*. Bandung: Universitas Padjadjaran.
- Nair, G., Balakrish., Thandavarayan, R., Sujit, K., Bhattacharya., Basabjit, D., Yoshifumi, T., & Sack, D.A. (2007). Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(1), 39-48.
- Rinanda, Y. (2008). *Penggunaan metode MPN-PCR (Most Probable Number-Polymerase Chain Reaction) untuk identifikasi bakteri Vibrio parahaemolyticus dan uji sensitivitasnya terhadap beberapa antibakteri*. (Skripsi). Padang: Fakultas Farmasi, Universitas Andalas.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning*. University of Texas South Western Medical Centre: Cold Spring Harbor Press.
- Sari, S.K., Listyorini, D., Mazieda, M.N., & Sulasmi, E.S. (2014). Optimasi teknik isolasi dan purifikasi DNA pada daun cabai rawit (*Capsicum frutescens* cv. Cakra Hijau) menggunakan Genomic DNA Mini Kit (Plant) GENE AID. *Proceeding Biology Education Conference: Biology, Science, Enviromental, and Learning*, 11(1), 65-70.
- Sujeewa, A.K.W., Norrakiah, A.S., & Laina, M. (2009). Prevalence of toxic genes of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimps (*Penaeus monodon*) and culture environment. *International Food Research Journal*, 16, 89-95.
- Suprpto. (2003). *Genetics: The continuity of life*. 4th ed. Wadsworth Publishing Company.
- Surzycki, S. (2000). *Basic techniques in molecular biology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Wong, H-C., Liu, S-H., Ku, L-W., Lee, I-Y., Wang, T-K., Lee, Y-S., Lee, C-L., Kuo, L-P, & Shih, Y-C. (1999). Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolates obtained from Food Poisoning Outbreaks during 1992-1995 in Taiwan. *JFP*, 99(289), 1-31.
- Wong, H-C. (2003). Detecting and molecular typing of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 11(2), 100-107.
- Utami, A., Meryalita, R., Prihatin, N.A., Ambarsari, L., Kurniatin, P.A., & Nurcholis, W. (2012). Variation methods of DNA isolation from leaf of temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.). *Proceedings of the National Conference of Chemistry*, UNESA, Surabaya, 205-214.
- Yuherman. (2000). *Molecular characterization of vibrio species isolated from water sea*. Selangor, Malaysia: Faculty of Food and Biotechnology, University Putra Malaysia.