

DOI: <https://doi.org/10.21009/JRSKT.111.03>

Deteksi *Vibrio parahaemolyticus* Menggunakan Primer Gen *toxR2* dengan *Gradient Polymerase Chain Reaction*

Muktiningsih Nurjayadi^{1,2,a)*}, Ismaya Krisdawati^{1,2,b)}, Jefferson Lynford Declan^{1,2,c)}, Gladys Indira Putri^{1,2,d)}, Dandy Akbar Juliansyah^{1,2,e)}, Atikah Nur Rahmawati^{1,2,f)}, Anisa Fitriyanti^{1,2,g)}, Royna Rahma Musie^{1,2,h)}, Fera Kurniadewi^{1,2,i)}, Dalia Sukmawati^{2,3,j)}, Vira Saamia^{4,k)}, I Made Wiranatha^{4,l)}, Bassam Abomoelak^{5,m)}, Hesham Ali Elenshasy^{6,7,8,n)}

¹Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta, Gedung K.H. Hasjim Asj'ari, Lantai 6, Jalan Rawamangun Muka, Jakarta Timur, 13220, Indonesia

²Pusat Unggulan Iptek Pendeteksi Bakteri Patogen, Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat, Universitas Negeri Jakarta, Jl. Rawamangun Muka, Jakarta Timur, 13220, Indonesia

³Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta, Gedung K.H. Hasjim Asj'ari, Lantai 9, Jalan Rawamangun Muka, Jakarta Timur, 13220, Indonesia

⁴Pusat Laboratorium Forensik Badan Reserse Kriminal Polri, Kepolisian Negara Republik Indonesia, Cipambuan Bababakan Madang, Bogor, 1681, Indonesia

⁵Laboratorium Diagnostik Khusus Pediatrik Rumah Sakit Arnold Palmer, Orlando, FL 32806, Amerika Serikat

⁶Innovation Center in Agritechology for Advanced Bioprocessing (ICA), Universiti Teknologi Malaysia (UTM), Pagoh, Johor, Malaysia

⁷Departemen Teknik Kimia dan Energi, Fakultas Teknik, Universiti Teknologi Malaysia (UTM), Skudai, Johor Bahru, Malaysia

⁸City of Scientific Research and Technology Applications, New Burg Al Arab, Alexandria, Egypt.

*Email: ^{a)}Corresponding author: muktiningsih@unj.ac.id, ^{b)}ismayakrisdaris@gmail.com,

^{c)}declanpariury@gmail.com, ^{d)}gladysindiraputri@gmail.com, ^{e)}dandyakbar13@gmail.com,

^{f)}atikahr971@gmail.com, ^{g)}anisafitriyant@gmail.com, ^{h)}roynarahmam@gmail.com, ⁱ⁾fera@unj.ac.id,

^{j)}dalia-sukmawati@unj.ac.id, ^{k)}virasaamia@yahoo.com, ^{l)}madewiranatha67@gmail.com,

^{m)}bassam.abomoelak@orlandohealth.com, ⁿ⁾henshasy@ibd.utm.my

Informasi Artikel

Diterima: 28/05/2025

Direvisi: 29/06/2025

Online: 30/06/2025

Edisi: 30/06/2025

Abstrak

Makanan adalah kebutuhan vital, dengan kriteria utama adalah keamanan, kualitas, dan nilai gizi. Untuk memastikan keamanan makanan, diperlukan metode deteksi yang cepat dan akurat, terutama untuk mendeteksi bakteri patogen penyebab keracunan makanan. *Vibrio parahaemolyticus* merupakan bakteri patogen yang banyak ditemukan pada makanan laut. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan metode deteksi cepat *V. parahaemolyticus* dengan menargetkan gen *toxR2* menggunakan *Gradient Polymerase Chain Reaction*. Gen *toxR* dipilih karena fungsinya sebagai pengatur penting gen virulensi. Tahapan yang dilakukan meliputi desain primer, penyiapan sampel bakteri dari biakan murni, dan uji amplifikasi menggunakan PCR Gradien. Hasil uji amplifikasi menunjukkan bahwa pasangan primer *toxR2* berhasil mengamplifikasi pada suhu 58-62°C dengan dihasilkan

pita berukuran 137 bp. Berdasarkan hasil tersebut, dapat disimpulkan bahwa PCR Gradien dengan primer *toxR2* dapat diaplikasikan untuk mengembangkan alat deteksi *V. parahaemolyticus* dengan melakukan uji lanjutan seperti uji konfirmasi, uji spesifisitas, uji sensitivitas, dan uji pada pangan menggunakan *Real-Time Polymerase Chain Reaction*.

Kata kunci: deteksi cepat, *foodborne pathogen*, gen *toxR2*, PCR Gradien, *Vibrio parahaemolyticus*

Abstract

Food is a vital necessity, with the primary criteria being safety, quality and nutritional value. To ensure food safety, fast and accurate detection methods are needed, especially to detect pathogenic bacteria that cause food poisoning. Vibrio parahaemolyticus is a pathogenic bacteria that is commonly found in seafood. This study aims to develop a rapid detection method of Vibrio parahaemolyticus by targeting the toxR2 gene using Gradient Polymerase Chain Reaction. The toxR gene was chosen due to its role as major regulator of virulence gene expression. The stages carried out include primer design, preparation of bacterial samples from pure cultures, and amplification tests using Gradient PCR. The amplification test results showed that the toxR2 primer pair successfully amplified at a temperature of 58-62°C with a band measuring 137 bp. Based on these results, it can be concluded that Gradient PCR with toxR2 primers can be applied to develop Vibrio parahaemolyticus detection tools by conducting further tests such as confirmation tests, specificity tests, sensitivity tests, and tests on food using Real-Time Polymerase Chain Reaction.

Keywords: rapid detection, *foodborne pathogen*, *toxR2* gene, gradient PCR, *Vibrio parahaemolyticus*

Pendahuluan

Keamanan pangan saat ini semakin penting sebagai subjek studi dan menjadi fokus yang lebih besar karena penyakit bawaan pangan sering terjadi baik di negara maju maupun negara berkembang (BPOM, 2020; BPOM 2021; CDC, 2018; Cuttle *et al.*, 2012; Doyle *et al.*, 2015). Kasus-kasus ini lebih banyak terjadi di negara berkembang karena faktor-faktor seperti sanitasi yang buruk, fasilitas, kurangnya kesadaran masyarakat, atau gaya hidup yang tidak sehat (ICHRC, 2016; Laude *et al.*, 2016). Menurut BPOM, di Indonesia terdapat sekitar 20 juta kasus keracunan pangan setiap tahunnya. Hal ini menunjukkan pentingnya perhatian terhadap masalah keamanan pangan (BPOM, 2021). Sebanyak 52,4% dari 208 kasus keracunan pangan yang dilaporkan di DKI Jakarta pada tahun 2016 terkait dengan konsumsi makanan laut (Mabrurroh *et al.*, 2018).

Mikroorganisme seperti bakteri, virus, jamur, dan berbagai parasit merupakan penyebab biologis dari penyakit pangan dan dapat menginfeksi manusia melalui minuman atau makanan yang terkontaminasi (Ishii *et al.*, 2018). Bakteri patogen *Vibrio parahaemolyticus* merupakan salah satu bakteri yang dapat menyebabkan penyakit bawaan pangan pada makanan laut. Bakteri ini ditemukan secara alami di habitat muara dan laut di seluruh dunia dan menjadi kontributor utama penyakit yang berkaitan dengan konsumsi makanan laut (Newton *et al.*, 2012). Karena frekuensinya yang tinggi,

kejadiannya yang simultan, rentang usia yang beragam, dan cepatnya kasus yang terjadi, keracunan makanan sering disebut sebagai kasus luar biasa. Untuk menangani masalah ini secara efektif dan mengurangi jumlah pasien, sangat penting untuk mengembangkan teknik deteksi yang cepat, tepat, dan akurat (Hergens *et al.*, 2016; ICHRC, 2016).

Metode tradisional untuk mendeteksi *V. parahaemolyticus* dilakukan secara rutin, termasuk pengayaan kultur, penumbuhan pada media agar, dan identifikasi koloni yang dicurigai. Agar *Thiosulfate Citrate Bile Sucrose* (TCBS) sering digunakan untuk isolasi *V. parahaemolyticus*. Karena semua spesies yang tidak memfermentasi sukrosa, termasuk *V. mimicus* dan *V. vulnificus*, menghasilkan koloni berwarna hijau seperti *V. parahaemolyticus*, maka akan sulit untuk membedakan koloni mereka (Yonekita *et al.*, 2020). Berbagai teknik telah dikembangkan untuk mengidentifikasi bakteri bawaan pangan, termasuk PCR Gradien. Gen *toxR* dipilih karena fungsinya sebagai pengatur penting gen virulensi, di mana gen ini mengontrol berbagai elemen virulensi yang tidak berhubungan yang diperoleh melalui transfer gen lateral (Hubbard *et al.*, 2016). Gen *toxR* pada daerah 3261715-3262593 digunakan sebagai fokus penelitian ini karena gen ini bersifat spesifik dan fungsinya sebagai gen pengatur operon toksin yang berfungsi sebagai pengatur gen virulensi pada *Vibrio parahaemolyticus* (Zhao *et al.*, 2016). Primer *toxR1* dengan panjang ampikon 171 pasang basa (bp) pada daerah 3262224-3262375 telah diteliti sebelumnya. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan primer *toxR2* dengan panjang ampikon 137 bp pada daerah 3262106-3262224.

Gen *fimC* dengan panjang produk 95 pasang basa untuk kit deteksi *Salmonella typhi* dengan PCR Gradien dan *real-time* PCR telah berhasil dikembangkan pada penelitian sebelumnya (Nurjayadi *et al.*, 2017). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengembangkan metode deteksi cepat *Vibrio parahaemolyticus* dengan menargetkan gen *toxR2* menggunakan *Polymerase Chain Reaction* Gradien. Berdasarkan pengalaman dan tinjauan pustaka sebelumnya, diharapkan metode deteksi *Vibrio parahaemolyticus* dapat dikembangkan dengan dilakukan uji lanjutan seperti uji konfirmasi, uji spesifisitas, uji sensitivitas, dan uji pada pangan menggunakan *Real-Time Polymerase Chain Reaction*.

Metode

Gen *toxR* berukuran 879 bp ini berada pada rentang sekuen 3.261.715-3.262.593 dari *Vibrio parahaemolyticus* strain ATCC 17802, kromosom lengkap. Urutan nukleotida gen *toxR* *Vibrio parahaemolyticus* berdasarkan database situs NCBI memiliki Gene ID CP014046.2 (NCBI, 2021). Kandidat pasangan primer dianalisis menggunakan program Net-Primer untuk menentukan suhu leleh, kandungan Guanin-Sitosin, dimer, dan panjang ampikon. Desain primer yang dipilih harus memiliki panjang ampikon antara 5 dan 250 bp, panjang 18-24 basa, persentase Guanin-Sitosin (GC) 40-60%, jumlah dimer yang rendah, dan titik leleh 50-60°C. Primer yang dirancang untuk *toxR2* disintesis di laboratorium komersial *MacroGen Synthesis, Inc.*-Korea. Pengujian PCR primer dan gen ditunjukkan pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Urutan Primer *toxR2*

Gen Target	Primer	Sequence	Ukuran Ampikon
<i>toxR</i>	<i>toxR2-F</i>	5' – CTGATAACAATGACGCCTCT - 3'	137 bp
	<i>toxR2-R</i>	5' – AGGATTACAGCAGAAGCC - 3'	

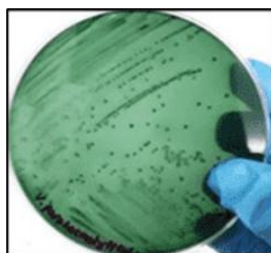
Pada penelitian ini, persiapan sampel kultur digunakan strain *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 dari Kwik-Stik (*Microbiologist*). Kemudian, bakteri tersebut dikultur dalam *Tryptic Soy Broth* (TSB) yang ditambahkan 2,5% Natrium klorida (NaCl) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 jam dalam inkubator shaker (YIHDER LM-400D). Media *Thiosulfate Citrate Bile Sucrose* (TCBS) (Merck) sebagai media untuk kultur bakteri dan identifikasi koloni yang tumbuh.

Hasil penumbuhan selanjutnya dilakukan isolasi DNA dengan 1,5 ml kultur bakteri *Vibrio parahaemolyticus* disentrifugasi selama 10 menit pada 5000xg. *Geno Plus Genomic DNA Extraction Miniprep Systems* (Viogene) digunakan untuk isolasi DNA. Dilakukan karakterisasi menggunakan Nanodrop (Nanovue Plus) berfungsi untuk menentukan konsentrasi isolasi DNA, kemudian dikonfirmasi dengan elektroforesis agar (NZYTech) dan divisualisasikan dengan transiluminator UV (Vilber Lourmat). Hasil isolasi DNA selanjutnya digunakan sebagai sample pada uji PCR Gradien.

Proses amplifikasi pasangan primer *toxR2* untuk mendeteksi bakteri *Vibrio parahaemolyticus* menggunakan PCR Gradien (Takara PCR Thermal Cycler Dice) dengan suhu 53°C - 62°C. Uji ini berisi sampel, kontrol positif, dan kontrol negatif dengan 25 µL sebagai total volume PCR yang berisi 12,5 µL NZYTa^q II 2× Colourless Master Mix, 5 µL template DNA *Vibrio parahaemolyticus*, 2,5 µL Nuclease Free Water (Qiagen), 2,5 µL *toxR2-f* (primer forward), dan 2,5 µL *toxR2-r* (primer reverse). Proses amplifikasi terdiri dari 35 siklus, diawali dengan proses denaturasi awal pada suhu 95°C selama 100 detik, dilanjutkan dengan denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, penempelan (*annealing*) pada suhu antara 53°C - 62°C selama 30 detik, pemanjangan (*extension*) pada suhu 72°C selama 1 menit, dan pemanjangan akhir pada suhu 72°C selama 10 menit. Hasil dari optimasi suhu *annealing* dapat dilihat dengan menggunakan elektroforesis.

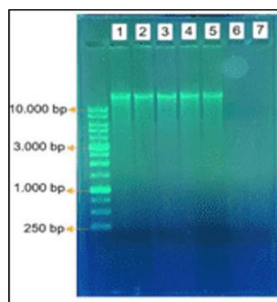
Hasil dan Pembahasan

Metode kultur sebagai metode tradisional memiliki spesifisitas yang tinggi dan harga yang murah, tetapi sering menghasilkan positif palsu dan membutuhkan waktu 2-3 hari untuk menentukan bakteri patogen bawaan makanan (Mirasoli *et al.*, 2011). Uji biokimia dan uji serologi diperlukan namun membutuhkan waktu yang lebih lama sehingga dapat berakibat fatal jika digunakan untuk penanganan kasus keracunan pangan yang membutuhkan waktu cepat. Penelitian ini menggunakan metode PCR Gradien untuk mendeteksi *Vibrio parahaemolyticus*, karena penyakit yang disebabkan oleh bakteri ini telah berkontribusi terhadap kejadian epidemi di Asia, Amerika Serikat, Chili, Eropa, dan Peru dalam beberapa dekade terakhir (Velazquez-Roman *et al.*, 2014). Hasil uji kultur ditunjukkan dengan dihasilkan koloni berwarna hijau pada permukaan media TCBS.



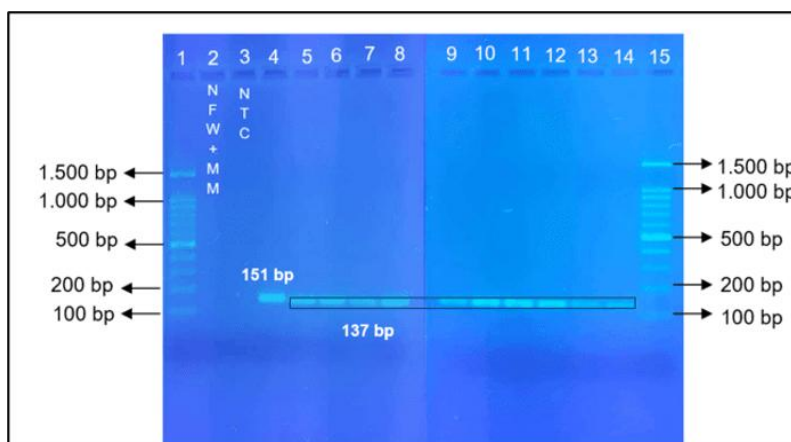
Gambar 1. Kultur bakteri *Vibrio parahaemolyticus* pada media TCBS

Uji selanjutnya yang dilakukan yaitu uji isolasi pada bakteri murni. Hasil isolasi DNA dapat dilakukan karakterisasi kualitatif dan kuantitatif. Pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA hasil isolasi dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer berdasarkan prinsip penyinaran oleh sinar ultraviolet yang diserap oleh nukleotida dan protein dalam larutan. Perbandingan absorbansi pada 260 nm dan 280 nm (A₂₆₀/A₂₈₀) dapat memberikan validasi kemurnian DNA. Hasil isolasi DNA dikatakan murni jika nilai rasio A₂₆₀/A₂₈₀ antara 1,8-2,0. Nilai rasio yang lebih rendah dari 1,8 mengindikasikan adanya kontaminasi protein sedangkan nilai rasio yang melebihi 2,0 mengindikasikan adanya kontaminasi RNA (Abdel-Latif *et al.*, 2017; Wasdili & Gartinah, 2018). Pada penelitian ini, didapatkan konsentrasi DNA murni sebesar 51 ng/µL dan kemurnian sebesar 1,816. Lalu didapatkan pita DNA yang terlihat lebih tinggi dari ukuran penanda 1 kilobase (kb) yaitu diatas 10.000 bp yang menunjukkan kesesuaian penelitian in-silico yaitu 3.288.558 bp (**Gambar 2**). Isolat yang dihasilkan pada uji ini selanjutnya dapat digunakan sebagai untuk uji PCR Gradien.



Gambar 2. Hasil elektroforesis isolat DNA *Vibrio parahaemolyticus*. (1) DNA Ladder 1000 bp; (2-5) Isolat DNA Genom *Vibrio parahaemolyticus*

Pada uji PCR Gradien membutuhkan komponen utama seperti primer. Desain primer dilakukan secara *in-silico* melalui web NCBI kemudian dikonfirmasi menggunakan program net-primer dan oligocalculator untuk memastikan kesesuaian dengan standar primer baik. Beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam proses perancangan primer yang baik untuk mengoptimalkan proses amplifikasi antara lain panjang primer, panjang amplicon, suhu leleh primer, %GC, *GC Lamp*, tidak terbentuknya struktur sekunder seperti *cross dimer*, *self-dimer*, *hairpin*, dan tidak ada pengulangan lebih dari tiga basa (Dorak, 2006; Bustin, et al., 2020). Primer untuk gen *toxR2* *Vibrio parahaemolyticus*, yang memiliki panjang amplicon 137 pasang basa didesain sebagai *toxR2* seperti yang ditunjukkan pada **Tabel 1**. Selanjutnya hasil PCR Gradien menunjukkan bahwa telah berhasil proses amplifikasi oleh pasangan primer *toxR2* mendeteksi keberadaan *Vibrio parahaemolyticus* ditandai dengan adanya pita terang dan stabil pada 137 bp diantara suhu 53°C - 62°C.



Gambar 3. Karakterisasi hasil optimasi suhu *annealing* gen *toxR2* dengan elektroforesis gel agarosa. (1) DNA Ladder 1.500 bp; (2) Kontrol Negatif (NFW+MM); (3) NTC; (4) *Cronobacter sakazakii* menghasilkan 151 bp sebagai Kontrol Positif; Suhu *annealing* annealing PCR (5) 53°C (6) 54°C; (7) 55°C; (8) 56°C; (9) 57°C; (10) 58°C; (11) 59°C; (12) 60°C; (13) 61°C; (14) 62°C; (15) DNA Ladder 1.500 bp.

Pada **Gambar 3** menunjukkan hasil PCR Gradien yang divisualisasikan menggunakan elektroforesis di bawah sinar UV. *Cronobacter sakazakii* menghasilkan 151 bp sebagai kontrol positif yang menunjukkan bahwa reaksi berjalan dengan baik. Primer *toxR2* menunjukkan pita amplifikasi pada 137 bp dengan suhu annealing 58°C-60°C untuk hasil yang optimal. Hal ini ditunjukkan dari keberadaan pita terang diatas ukuran 100 bp dan dibawah 200 bp, selain itu hasil yang didapat sesuai dengan uji secara *in-silico*. Kontrol negatif menunjukkan pita fragmen tipis dibawah ladder 100 bp, hal menunjukkan sisa primer *toxR* yang tidak ditambahkan template bakteri target.

Kesimpulan

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa primer *toxR2* berhasil mendeteksi DNA *Vibrio parahaemolyticus*. Berdasarkan hasil kultur murni didapatkan koloni berwarna hijau pada media TCBS. Karakterisasi kuantitatif DNA hasil isolasi menggunakan Nanodrop didapatkan kemurnian sebesar 51 ng/μL dan kemurnian sebesar 1,816. Sedangkan hasil karakterisasi kualitatif menggunakan elektroforesis gel agarose didapatkan pita diatas 10.000 bp yang menunjukkan kesesuaian penelitian *in-silico* yaitu 3.288.558 bp. Primer gen *toxR2* mampu mengamplifikasi fragmen DNA bakteri *V. parahaemolyticus* dengan panjang ampikon 137 bp. Metode deteksi primer *toxR2* *V. parahaemolyticus* menggunakan PCR Gradien dapat dikembangkan menjadi metode deteksi yang lebih cepat, spesifik dan sensitif. Namun perlu dilakukan pengujian lanjutan seperti uji konfirmasi, uji spesifisitas, uji sensitivitas, dan uji coba pangan dengan menggunakan metode lanjutan seperti *Real-Time Polymerase Chain Reaction* untuk memastikan keefektifan dan keakuratan metode dalam mendeteksi keberadaan patogen *V. parahaemolyticus*.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini didanai oleh Penelitian dengan Skema Riset Inovasi untuk Indonesia Maju (RIIM) Badan Riset Inovasi Nasional (BRIN) Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP) dengan nomor kontrak 3/RIIM II/LPPM/IV/2023 dan Penelitian Produk Inovasi 2025 LPPM Universitas Negeri Jakarta. Selain itu, kami juga mengucapkan terima kasih kepada PT Sinergi Indomitra Pratama yang telah menyediakan instrumen untuk penelitian ini, Pusat Laboratorium Forensik Kepolisian Republik Indonesia (Puslabfor Polri), Sentul Bogor Indonesia, yang telah mendukung penelitian ini berdasarkan MOU antara UNJ dan Puslabfor dan tim Salmonella UNJ di Pusat Unggulan Iptek Pendeteksi Bakteri Patogen (PUI Pendeteksi Bakteri Patogen) LPPM UNJ atas kerja keras dan kontribusinya. Apresiasi juga kami sampaikan kepada mitra internasional kami, IBD-UTM, yang dukungannya sangat penting untuk semua upaya kolaborasi dan keahliannya.

Daftar Pustaka

- Abdel-Latif, G., & Osman, G. (2017). Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. *Plant Methods*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s13007-016-0152-4>
- BPOM. (2020). *Laporan Tahunan Badan POM 2020*. Badan Pengawas Obat dan Makanan.
- BPOM. (2021). *Laporan Tahunan Badan POM 2021*. Badan Pengawas Obat dan Makanan.
- Bustin SA, Mueller R, Nolan T. (2020). Parameters for Successful PCR Primer Design. *Methods Mol Biol*. 2065:5-22. doi:10.1007/978-1-4939-9833-3_2
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2018). *CDC estimates of foodborne illness in the United States*. <https://www.cdc.gov/foodborneburden/index.htm>
- Dorak, T. (2006). Real-Time PCR. In *Taylor and Francis Group*, (Vol. 112). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405914-6.00003-2>
- Doyle, M. P., Erickson, M. C., Alali, W., Cannon, J., Deng, X., Ortega, Y., Smith, M. A., & Zhao, T. (2015). The food industry's current and future role in preventing microbial foodborne illness within the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 61(2), 252–259. <https://doi.org/10.1093/cid/civ25>
- F. Mabruroh, & Ciptaningtyas, R. (2018). *Analysis of food poisoning in DKI Jakarta 2016 (Indonesian National Agency Drug and Food Control)*.
- Hergens, M. P., Nederby Ohd, J., Alm, E., Askling, H. H., Helgesson, S., Insulander, M., Lagerqvist, N., Svenungsson, B., Tihane, M., Tolfvenstam, T., & Follin, P. (2017). Investigation of a food-borne outbreak of gastroenteritis in a school canteen revealed a variant of sapovirus genogroup V not detected by standard PCR, Sollentuna, Sweden, 2016. *Eurosurveillance*, 22(22). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.22.30543>

- Hubbard TP, Chao MC, Abel S, Blondel CJ, Abel Zur Wiesch P, Zhou X, Davis BM, Waldor MK. (2016). Genetic analysis of *Vibrio parahaemolyticus* intestinal colonization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 113(22):6283-8. doi: 10.1073/pnas.1601718113.
- ICHRC. (2016). *Keracunan Makanan*. <https://www.ichrc.org/155keracunan-makanan>
- Ishii, S., Segawa, T., & Okabe, S. (2013). Simultaneous quantification of multiple food- and waterborne pathogens by use of microfluidic quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(9), 2891–2898. <https://doi.org/10.1128/aem.00205-13>
- Laude, J. R., Stagner, J. P., Rayburn-Reeves, R., & Zental, T. R. (2016). Who are the real bird brains? Qualitative differences in behavioral flexibility between dogs (*Canis familiaris*) and pigeons (*Columba livia*). *Animal Cognition*, 19, 163–169. <https://doi.org/10.3758/s13420-013-0122-x>
- L. Cuttle, Corley, S. W., Gray, C. P., Vanderlinde, P. B., Jackson, L. A., & Traub, R. J. (2012). Real-time PCR as a surveillance tool for the detection of *Trichinella* infection in muscle samples from wildlife. *Veterinary Parasitology*, 188(3–4), 285–293. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.03.054>
- NCBI. (2021). *Vibrio parahaemolyticus strain ATCC 17802 complete chromosome 1*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP014046.2>
- Newton, A., Kendall, M., Vugia, D. J., Henao, O. L., & Mahon, B. E. (2012). Increasing rates of vibriosis in the United States, 1996–2010: Review of surveillance data from 2 systems. *Clinical Infectious Diseases*, 54(Suppl. 5), S391–S395. <https://doi.org/10.1093/cid/cis243>
- Nurjayadi, M., Santoso, I., Kartika, I. R., Kurniadewi, F., Saamia, V., Sofihan, W., & Nurkhasanah, D. (2017). Isolation, amplification, and characterization of foodborne pathogen disease bacteria gene for rapid kit test development. *AIP Conference Proceedings*. <https://doi.org/10.1063/1.4991181>
- Velazquez-Roman, J., Leon-Sicairos, N., Hernandez-Diaz, L., & Canizalez-Roman, A. (2014). Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 on the American continent. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3, 110. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00110>
- Wasdili, F. A. Q., & Gartinah, T. (2018). Penentuan Kualitas Isolasi DNA *Salmonella Typhimurium* dengan Metode Spektrofotometri dan Elektroforesis. *Prosiding Pertemuan Ilmiah Nasional Penelitian & Pngabdian Masyarakat (PINLITMAS 1)*, 1(1), 578–583
- Yonekita, T., Morishita, N., Arakawa, E., & Matsumoto, T. (2020). Development of a monoclonal antibody for specific detection of *Vibrio parahaemolyticus* and analysis of its antigen. *Journal of Microbiological Methods*, 173, 1059. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.1059>