

## Deteksi Dini Kontaminasi *Vibrio parahaemolyticus* dan *Escherichia coli* pada Produk Perikanan Dengan *Multiplex Polymerase Chain Reaction*

### *Early Detection of Vibrio parahaemolyticus and Escherichia coli Contamination in Fisheries Product Using Multiplex Polymerase Chain Reaction*

Nur Hasanah<sup>1</sup>, Putu Eka Sudaryatma<sup>2\*</sup>, Imanuddin Razaq<sup>2</sup>, Ni Nyoman Eriawati<sup>2</sup>, Wahyu Andy Nugraha<sup>1</sup>, Hidayati Kumalasari<sup>1</sup>, Ni Putu Arya Shintya Anggraeni<sup>3</sup>, Ida Ayu Mirah Meliana Dewi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Ilmu Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Trunojoyo Madura

<sup>2</sup>Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Denpasar

<sup>3</sup>Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana

\*Penulis korespondensi: [putueka.sudaryatma@gmail.com](mailto:putueka.sudaryatma@gmail.com)

Naskah diterima: 28 Februari 2022, direvisi: 16 Maret 2022, disetujui: 17 Maret 2022

#### Abstract

The fisheries sector has provided a good contribution to the Indonesian economy by increasing export activities every year. The exported fisheries products are categorized as live fish, frozen fish, preservation products from various types of fish, crustaceans, and molluscs. The contamination of pathogenic bacteria, such as *Vibrio parahaemolyticus* and *Escherichia coli* causes healthy problems originating from the fishery sector (seafood-borne disease). The contaminated fisheries products by these two bacteria is due to mishandling and storing in the processing, which causes acute diarrhea, gastrointestinal infections, and fever. The multiplex polymerase chain reaction (mPCR) method was developed to increase the efficiency of time, effort, and accuracy of the bacterial contamination testing process. The mPCR method begins with the optimization of the two bacterial gene targets, sensitivity test, specificity test, and then applied to samples of fishery products. The mPCR method was carried out in two mechanisms, namely "one-run" conducted from bacterial colonies isolated on agar media and "one-tube" which is applied directly from fishery products. The results of the development of the mPCR method on *V. parahaemolyticus* and *E. coli* resulted in sensitivity at concentrations of DNA 5.6 pg/mL and DNA 5.5 pg/mL, respectively. One-tube mPCR application obtained 7 positive colonies of *V. parahaemolyticus* and 38 positive colonies of *E. coli*. Meanwhile, one-tube mPCR which was applied directly from shrimp samples could identify the two bacteria.

**Keywords:** Pathogenic bacteria, *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, Multiplex PCR, Fisheries products

#### Abstrak

Sektor perikanan memberikan kontribusi yang baik terhadap perekonomian Indonesia melalui peningkatan kegiatan ekspor setiap tahunnya. Produk ekspor unggulan Indonesia dikategorikan dalam bentuk ikan hidup, ikan beku, produk pengawetan dari berbagai jenis ikan, crustacea, dan molusca. Kontaminasi bakteri patogen *Vibrio parahaemolyticus* dan *Escherichia coli* dapat menyebabkan masalah kesehatan yang bersumber dari sektor perikanan (*seafood-borne disease*). Kontaminasi kedua bakteri tersebut pada produk perikanan akibat kesalahan penanganan dan penyimpanan pada proses pengolahan produk yang menimbulkan diare akut, infeksi saluran pencernaan dan demam. Metode *multiplex polymerase chain reaction* (mPCR) dikembangkan untuk meningkatkan efisiensi waktu, tenaga dan ketepatan proses pengujian kontaminasi bakteri. Metode mPCR diawali dengan optimasi dari amplifikasi kedua target gen bakteri, uji sensitifitas, uji spesifisitas dan kemudian diaplikasikan pada sampel produk perikanan. Metode mPCR dilakukan dalam dua mekanisme yaitu *one-run* dari koloni bakteri hasil isolasi pada media agar dan *one-tube* yang diaplikasikan langsung dari produk perikanan. Hasil pengembangan metode mPCR pada *V. parahaemolyticus* dan *E. coli* menghasilkan

sensitivitas pada konsentrasi DNA 5,6 pg/ml dan DNA 5,5 pg/ml, secara berurutan. Aplikasi mPCR *one-tube* memperoleh 7 koloni positif *V. parahaemolyticus* dan 38 koloni positif *E. coli*. Sedangkan mPCR *one-tube* yang diaplikasikan secara langsung dari sampel udang dapat mengidentifikasi kedua bakteri tersebut.

**Kata kunci:** Bakteri patogen; *Escherichia coli*; *Multiplik PCR*; Produk perikanan; *Vibrio parahaemolyticus*.

## Pendahuluan

Sektor perikanan dan kelautan Indonesia merupakan sektor yang bernilai tinggi dan berpotensi untuk dikembangkan dalam meningkatkan perekonomian masyarakat Indonesia (Luhur et al., 2019). Potensi tersebut menunjukkan peningkatan nilai produk domestik bruto dari tahun 2015 (5.363.274 ton) meningkat menjadi 6.242.846 ton pada tahun 2018 (Miar et al., 2020). Nilai ekspor produk perikanan tahun 2011-2015 menunjukkan peningkatan hingga 2,29 % pada kategori ikan hidup, ikan beku, produk moluska dan *crustacea* (Luhur et al., 2019). Akan tetapi, potensi tersebut juga mendapat tantangan dalam hal penurunan kualitas produk sehingga menyebabkan kasus penolakan pada ekspor produk perikanan di negara tujuan (Nurilmala et al., 2020). Salah satunya adalah kontaminasi bakteri patogen pada produk perikanan yang berawal dari proses budidaya atau penangkapan sampai dengan pengolahan produk (Schmidt et al., 2018).

Kontaminan bakteri patogen banyak ditemukan pada produk perikanan mentah dan produk olahan (Sahu et al., 2019). Penyakit kontaminasi bakteri pada makanan dan air minum di Uni Eropa tahun 2015 mencapai 4,362 kasus yang disebabkan oleh bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dan *Escherichia coli* (Bintsis, 2017). *V. parahaemolyticus* tergolong dalam bakteri gram negatif, berbentuk batang, bersifat halofilik, dan membutuhkan salinitas pada proses pertumbuhannya (Jiang et al., 2017) yang dapat mengkontaminasi makanan, berhabitat dari perairan payau, muara dan laut (Chen et al., 2018). Bakteri ini dapat menyebabkan gastroenteritis pada manusia dengan gejala klinis yaitu kram perut, demam, mual, muntah, dan diare yang disertai darah (Chen et al., 2018). Selain *V. parahaemolyticus*, diare akut dapat disebabkan oleh *E. coli* yang tergolong dalam bakteri gram negatif, berbentuk batang, aerob fakultatif (Sartika, 2018) dan bersifat komensal pada saluran pencernaan manusia dan hewan yang dapat

mensistensis vitamin K (Sartika, 2018). Patogenitas bakteri *E. coli* disebabkan oleh kemampuan dalam membentuk toksin (Bintsis, 2017).

*Hazard Analysis and Critical Control Point* (HACCP) merupakan salah satu upaya untuk memaksimalkan keamanan pangan dan menjaga kualitas mutu produk perikanan yang diperlukan pada proses penanganan, pengolahan dan penyimpanan yang tepat dari produk perikanan (Herdiana, 2015). Ancaman penyebaran penyakit melalui makanan menjadikan negara tujuan ekspor seperti China, Australia, Kanada, Jepang, Amerika dan Uni Eropa mempersyaratkan HACCP sebagai standar keamanan pangan pada produk perikanan (Alwy, 2017) pada proses pengolahan produknya (Lailossa, 2015). Salah satu bahaya yang harus dikontrol dalam proses pengolahan produk perikanan adalah kontaminasi *V. parahaemolyticus* dan *E. coli* sebagai standar mutunya (Fakruddin et al., 2013).

Metode yang digunakan untuk mendeteksi kontaminasi bakteri pada produk pangan asal perikanan telah banyak dikembangkan (de Lira et al., 2020). Akan tetapi, metode yang sering digunakan adalah metode konvensional menggunakan uji biokimia yang memerlukan waktu hingga 7 – 8 hari dan tidak efektif digunakan dalam pengujian dengan jumlah sampel skala besar (Jiang et al., 2017). Oleh sebab itu, banyak dikembangkan metode *polymerase chain reaction* (PCR) untuk pengujian dalam skala besar yang dapat dilakukan lebih cepat, spesifik dan sensitif sehingga menghasilkan tingkat deteksi yang lebih baik (Fakruddin et al., 2013). Pengembangan metode PCR terus dilakukan, salah satunya adalah metode *multiplex-PCR* mPCR yang memungkinkan pendeteksian dua atau lebih jenis gen target dalam satu waktu pengujian (Jiang et al., 2017). Metode mPCR memberikan hasil cepat dan akurat dibandingkan dengan metode konvensional PCR dalam kegiatan pemeriksaan makanan produk perikanan (Sahu et al., 2019).

Badan Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan merupakan instrument pelayanan pemerintah dibawah Kementerian Kelautan dan Perikanan yang melakukan *official control* pengendalian mutu dan keamanan produk perikanan dalam melakukan pengujian laboratorium sebelum dilalulintaskan pada pasar domestik dan ekspor (Raudiah *et al.*, 2021), salah satu unit pelaksanaan teknisnya adalah Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Denpasar (Balai KIPM Denpasar) yang berada di Provinsi Bali. Penggunaan metode mPCR dapat menjadi solusi pengujian yang efektif dan efisien yang dibutuhkan oleh Balai KIPM Denpasar guna menunjang kegiatan *official control*. Oleh karena itu, dibutuhkan pengembangan metode mPCR untuk mendeteksi *V. parahaemolyticus* dan *E. coli* secara simultan, sehingga diperlukan analisa sensitifitas dan spesifisitas untuk mengetahui ketepatan hasil analisa (Nguyen *et al.*, 2016). Tujuan dari penelitian ini adalah memperoleh metode biologi molekuler yang lebih cepat, efisien dan akurat dalam mendeteksi kontaminasi bakteri *V. parahaemolyticus* dan *E. coli* pada produk perikanan.

## Materi dan Metode

### Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Denpasar (Balai KIPM Denpasar) dari bulan September hingga Desember 2021. Proses pengambilan sampel di unit usaha pembudidaya ikan, unit pengolahan ikan, pasar tradisional dan modern dilakukan secara khusus oleh Inspektur Balai KIPM Denpasar dalam pengendalian kesehatan ikan, mutu dan keamanan produk perikanan. Seluruh sampel yang diambil (dalam bentuk ikan hidup dan produk olahan perikanan) dilanjutkan dengan pengujian sesegera mungkin setelah sampai di laboratorium, untuk menghindari kematian dan penurunan mutu sampel.

### Kultur dan Pengembangbiakan Bakteri

Bakteri yang digunakan sebagai kontrol positif merupakan bakteri target pengujian dan bakteri lainnya sebagai non-target pengujian

yang dimiliki oleh Balai KIPM Denpasar sesuai dengan Tabel 1. Pengembangbiakan bakteri dilakukan pada media *Nutrient broth* (NB; Merck, Germany) sesuai dengan metoda yang dikembangkan oleh (Hu *et al.*, 2020). Koleksi bakteri dari media semi-solid ditambahkan 500 µL NB kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Tahap selanjutnya 10 µL kultur bakteri dipindahkan kedalam 10 mL NB yang baru dan diinkubasikan kembali selama 24 jam dengan suhu 37°C. Perhitungan kepadatan bakteri dilanjutkan menggunakan pengujian angka lempeng total dengan pengenceran kelipatan 10 menggunakan metode tuang pada media *plate count agar* (PCA; Merck, Germany) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Kemudian koloni bakteri dihitung sebagai CFU/mL. Kultur bakteri ini digunakan sebagai stok pada seluruh pengujian yang dilakukan.

Table 1. Strain Bakteri yang Digunakan untuk Pengujian Spesifisitas multiplex-PCR

Strain Bakteri	Source
<b>Bakteri Target</b>	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 17802
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<b>Bakteri Non-Target</b>	
<i>Aeromonas salmonicida</i>	ATCC 7965
<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC 35654
<i>Enterococcus faecalis</i>	Isolat klinis
<i>Edwardsiella ictaluri</i>	Isolat klinis
<i>Edwardsiella tarda</i>	ATCC 15947
<i>Salmonella</i> sp	NCTC 6017

### Ekstraksi DNA Bakteri

Stok bakteri dilakukan ekstraksi DNA dengan mengacu pada metode dari (Sahu *et al.*, 2019) dengan sedikit modifikasi, yaitu 500 µL stok bakteri dimasukkan pada *microtube* 1,5 mL dan disentrifugasi selama 5 menit pada kecepatan 15.000 × rpm menggunakan alat sentrifugasi dingin (Clever Scientific Ltd., UK). Kemudian supernatan dibuang dan ditambahkan 200 µL *Nuclease-free water* (NFW; Qiagen, Germany) pada *microtube* dan dilakukan vortex. Proses dilanjutkan pemanasan bakteri pada *thermoblock* (Labnet, China) dengan suhu 95 °C selama 6 menit. Setelah pemanasan, dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 15.000 × rpm selama 5 menit dan supernatant disimpan pada suhu -20 °C sebelum digunakan. Konsentrasi DNA dianalisa menggunakan spektrofotometer

(Perkin Elmer, USA) pada panjang gelombang 260, selanjutnya nilai absorbansi dikonversi menjadi konsentrasi total DNA berdasarkan rumus dari (Mustafa *et al.*, 2016).

### Oligonukleotida dari Primer

Primer yang digunakan untuk mendeteksi *V. parahaemolyticus* sesuai dengan (Kongchum *et al.*, 2016) menggunakan target gen *irgB* dengan 369 bp produk amplifikasi PCR, sebagai berikut: VP-irgF (5'-CGATACACACCACGATCCAG-3') dan VP-irgR (5'-ATACGGCCGGGGTGATGTTTCT-3'). Sedangkan primer yang digunakan untuk mendeteksi bakteri *E. coli* menggunakan target gen *lacZ* yang menghasilkan 876 bp produk PCR sesuai yang dilaporkan oleh (Molina *et al.*, 2015) yaitu: ZL-1675 (5'-ATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCC-3') dan ZR-2548 (5'-CACCATGCCGTGGGTTT CAATATT-3'). Seluruh primer ini diproduksi oleh *Integrated DNA Technology* (IDT, Singapore).

### Optimalisasi multiplex-Polymerase Chain Reaction

Optimalisasi *multiplex*-PCR mPCR dilakukan dalam dua metoda yaitu "one-run" dan "one-tube". Metoda mPCR "one-run" yaitu proses amplifikasi masing-masing target gen bakteri secara bersamaan pada tube yang berbeda. Sedangkan mPCR "one-tube" dengan melakukan proses amplifikasi kedua target gen bakteri secara bersamaan menggunakan reagen *master mix* dalam satu tube yang berisikan kedua primer target bakteri tersebut (Nguyen *et al.*, 2016). Sebelum dilakukan mPCR, kedua primer dioptimalisasi masing-masing target gen dengan kondisi amplifikasi yang meliputi tiga tahapan, yaitu proses denaturasi 94 °C selama 1 menit pada tahap awal, diikuti dengan tahap kedua 30 siklus (denaturasi 94 °C selama 30 detik, *annealing* 58 °C selama 30 detik dilanjutkan ekstensi 72 °C selama 30 detik) dan tahap ekstensi akhir 72 °C selama 5 menit. Suhu *annealing* (55 – 60 °C) dan konsentrasi masing-masing primer (0,2 – 0,5 µM) menjadi parameter yang dirubah dalam proses amplifikasi sampai mendapatkan hasil yang maksimal. Seluruh kegiatan optimalisasi PCR menggunakan reagen *MyTaq HS MixII*

(Bioline, Germany) dengan total 25 µl setiap reaksi. Proses amplifikasi menggunakan alat *thermocycler* (Labnet-Multigene, USA) dan hasil amplifikasi dielektroporesis menggunakan Mupid-one (Advance, Jepang) dengan media 1,5% Agarose (Biorad, USA) yang berisikan 3% *Gel-red* (Milipore, USA) sebagai pewarna nukleotida. Produk amplifikasi 369 bp dan 876 bp merupakan target PCR *V. parahaemolyticus* dan *E. coli* secara berurutan, yang didokumentasikan menggunakan UV-transilluminaor (Clever Scientific, UK) dan aplikasi *UVITEC-Cambridge* (UVITEC, UK). Tahapan *annealing* yang optimal didapatkan pada suhu 58 °C untuk kedua metoda amplifikasi mPCR. Sedangkan konsentrasi yang optimal dari masing-masing oligonukleotida kedua pasang primer adalah 0,32 µM dan digunakan pada metoda "one-run" dan "one-tube" mPCR.

### Uji Sensitifitas multiplex-Polymerase Chain Reaction

Uji sensitifitas mPCR yaitu metoda untuk melihat kemampuan formulasi primer dan kesesuaian tahapan amplifikasi dalam mendeteksi konsentrasi minimal keberadaan kedua gen target dua bakteri tersebut (Nguyen *et al.*, 2016). Uji sensitifitas dilakukan dengan mengencerkan stok kultur bakteri *V. parahaemolyticus* dan *E. coli* dari 10<sup>1</sup> – 10<sup>10</sup> (pengenceran kelipatan 10) yang ditumbuhkan selama 24 jam. Masing-masing pengenceran bakteri diekstraksi untuk mendapatkan DNA dan diukur konsentrasinya menggunakan spektrofotometer. Uji sensitivitas dilakukan dengan kedua metoda mPCR menggunakan proses amplifikasi yang diperoleh pada tahapan optimalisasi diatas.

### Uji Spesifisitas multiplex-Polymerase Chain Reaction

Uji spesifisitas mPCR adalah uji untuk melihat apakah primer dari target gen yang diamplifikasi spesifik terhadap bakteri target (*V. parahaemolyticus* dan *E. coli*) dan tidak mengamplifikasi bakteri lainnya. Setiap bakteri target dan delapan strain bakteri non-target (pada Tabel 1) diamplifikasi menggunakan proses amplifikasi pada metoda "one-run" dan "one-tube" mPCR.



### Aplikasi multiplex-Polymerase Chain Reaction Pada Produk Perikanan

Sampel produk perikanan berjumlah 365 sampel yang digunakan dalam penelitian ini meliputi ikan hias laut, ikan kerapu, udang dan produk pengolahan perikanan (ikan beku dan segar). Persiapan dan perlakuan sampel pada aplikasi mPCR untuk *V. parahaemolyticus* mengacu pada metode SNI 01-2332.5-2006 dan SNI 2332-13:2020 dengan sedikit modifikasi. Secara singkat, sampel dilakukan pengkayaan pada media *Alkaline Phosphate Saline* (APS) selama 24 jam, diinokulasikan pada media selektif *Thiosulphate Citrate Bile-salt Sukrosa Agar* (TCBSA; Sigma Aldrich, India) selama 24 jam pada suhu 37°C. Sedangkan untuk *E. coli* menggunakan SNI 2332.1:2015 sebagai acuan, dengan menggunakan media pengkayaan *Lauryl Sulfate Broth* (LTB) yang dilanjutkan dengan isolasi pada media *Levine Eosin Methylene Blue Agar* (L-EMBA; Sigma Aldrich, India). Koloni bakteri berbentuk bulat berwarna hijau gelap yang tumbuh pada TCBS terindikasi *V. parahaemolyticus*. Sedangkan bakteri yang berwarna hijau metalik pada media L-EMBA terindikasi *E. coli*. Kedua jenis bakteri tersebut dilanjutkan dengan pengujian dengan ekstraksi DNA dan amplifikasi mPCR *one-run* sesuai dengan metoda diatas.

Sedangkan untuk aplikasi *one-tube* mPCR, sampel udang segar dilakukan pengkayaan pada media *Trypticase Soy Broth* (TSB) sesuai

penelitian dari (Yang *et al.*, 2020) dengan modifikasi. Sepuluh sampel udang (*Litopenaeus vannamei*) digerus secara steril, kemudian ditambahkan media TSB dan diinkubasi 48 jam pada suhu 37°C. Sampel selanjutnya diekstraksi dan diamplifikasi menggunakan metode *one-tube* mPCR sesuai metoda diatas.

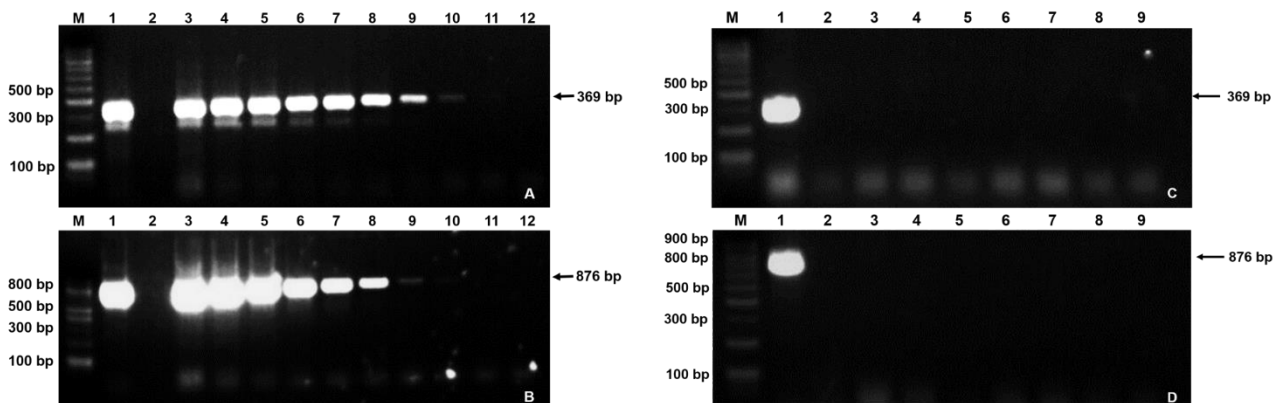
### Hasil dan Pembahasan

#### Hasil

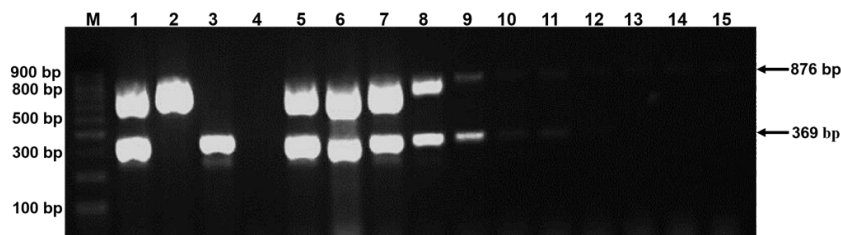
#### Sensitivitas multiplex-Polymerase Chain Reaction

Pada tahapan optimalisasi mPCR *one-run*, suhu *annealing* yang optimal pada 58 °C dan konsentrasi masing-masing primer 0,32 uM untuk medeteksi bakteri *V. parahaemolyticus* dan *E. coli*. Aplikasi metoda mPCR pada *V. parahaemolyticus* menggunakan primer *irgB* menghasilkan sensitivitas kepadatan bakteri mencapai 2,1 CFU/ml (metoda ALT) pada konsentrasi DNA 5,6 pg/mL yang masih menghasilkan *band* PCR pada 369 bp (Gambar 1A). Sedangkan pada *E. coli* yang menggunakan primer *lacZ* yang menghasilkan sensitifitas hingga kepadatan bakteri 4,65 CFU/mL pada konsentrasi DNA 5,5 pg/ml pada produk PCR 876 bp (Gambar 1B).

Sedangkan sensitifitas mPCR *one-tube* yang diamplifikasi pada suhu *annealing* 58°C dengan berisikan dua set primer *irgB* dan *lacZ*



Gambar 1. Sensitivitas dan spesifisitas *multiplex-PCR* metode *one-run* pada *V. parahaemolyticus* dan *E. coli* dengan primer *irgB* dan *lacZ*. (A) Sensitivitas *V. parahaemolyticus*, M: Marker 100 bp, 1: *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, 2: *Nucleus-free water*, 3 – 12: Pengenceran *V. parahaemolyticus*  $10^{-1}$  hingga  $10^{-10}$ . (B) Sensitivitas *E. coli*: M. Marker 100 bp, 1. *E. coli*, 2: *Nucleus-free Water*, 3 – 12: Pengenceran *V. parahaemolyticus*  $10^{-1}$  hingga  $10^{-10}$ . (C). Spesifisitas primer *irgB*, M: Marker 100 bp, 1: *V. parahaemolyticus*, 2: *Nucleus-free water*, 3: *E. coli* ATCC 25922, 4: *A. hydrophila* ATCC 35654, 5: *A. salmonicida* ATCC 7965, 6: *Salmonella* sp. NCTC 6017, 7: *E. ictaluri* isolat klinis, 8: *E. faecalis* isolat klinis, 9: *E. tarda* ATCC 15947. (D) Spesifisitas primer *lacZ*, M: Marker 100 bp, 1: *E. coli* ATCC 25922, 2: *Nucleus-free water*, 3: *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, 4: *A. hydrophila* ATCC 35654, 5: *A. salmonicida* ATCC 7965, 6: *Salmonella* sp. NCTC 6017, 7: *E. ictaluri* isolat klinis, 8: *E. faecalis* isolat klinis, 9: *E. tarda* ATCC 15947.



Gambar 2. Hasil uji sensitifitas multiplex-PCR metode one-tube; M. Marker 100 bp, 1. Kontrol positif yang digabungkan (*V. parahaemolyticus* ATCC 17802 dan *E. coli* ATCC 25922), 2. Kontrol positif *E. coli* ATCC 25922, 3. Kontrol positif *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, 4. Nucleus-free water, 5 – 15. Pengenceran kontrol positif yang dari  $10^{-1}$  hingga  $10^{-10}$ .

dengan konsentrasi masing-masing 0,32  $\mu$ M, berhasil mendeteksi bakteri *V. parahaemolyticus* dan *E. coli* hingga konsentrasi DNA 0,771 ng/mL seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.

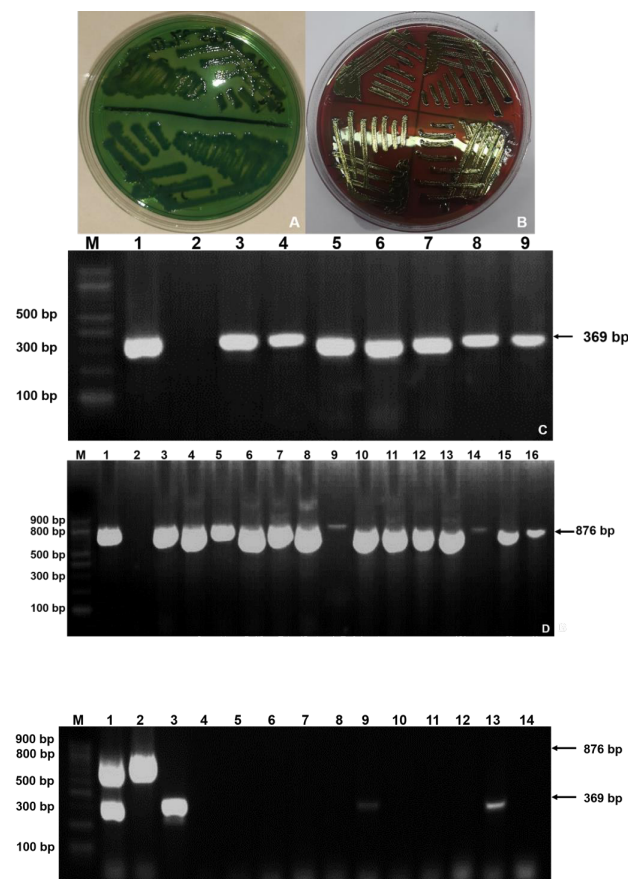
### Spesifisitas Primer pada multiplex-Polymerase Chain Reaction

Primer *V. parahaemolyticus* (*irgB*) dan *E. coli* (*LacZ*) yang digunakan pada mPCR tidak dapat mendeteksi bakteri *non-target* (*A. hydrophila* ATCC 35654, *A. salmonicida* ATCC No. 7965, *Salmonella sp* NCTC No. 6017, *E. ictaluri* isolat klinis, *E. faecalis* isolat klinis, *E. tarda* ATCC No. 15947) yang ditunjukkan pada Gambar 1. Hasil ini menunjukkan spesifisitas primer *irgB* dan *lacZ* yang digunakan tidak dapat mendeteksi keberadaan bakteri lain selain bakteri *V. parahaemolyticus* dan *E. coli*.

### Aplikasi mPCR (one-run) Pada Koloni Bakteri dari Produk Perikanan

Isolasi *V. parahaemolyticus* dan *E. coli* dilakukan dengan media pengkayaan APS dan LTB selama 24 jam pada suhu 37°C. Kemudian dilanjutkan dengan inokulasikan pada media selektif TCBSA (*V. parahaemolyticus*) dan L-EMBA (*E. coli*). Karakteristik koloni bakteri yang dilanjutkan untuk uji mPCR *one-tube* yaitu koloni bulat dengan warna hijau gelap untuk *V. parahaemolyticus* (Gambar 3A) dan koloni bulat berwarna hijau metalik untuk *E. coli* (Gambar 3B). Sampel isolasi yang memiliki karakteristik koloni hijau pada media TCBSA berjumlah 96 sampel dan terdapat 7 sampel positif *V. parahaemolyticus* pada uji mPCR yang ditunjukkan pada gambar 3C. Sedangkan koloni berwarna hijau metalik pada L-EMBA ditemukan sebanyak 52 koloni,

setelah dilakukan mPCR maka dihasilkan 38 sampel koloni positif *E. coli* pada uji mPCR seperti gambar 3D. Sampel produk perikanan yang berhasil terdeteksi kontaminan bakteri *V.*



Gambar 3. Hasil isolasi koloni bakteri yang dilakukan pengujian *multiplex-PCR* metode *one-run*. Koloni yang berwarna hijau gelap terindikasi *V. parahaemolyticus* pada media TCBSA (A) dan koloni yang berwarna hijau metalik terindikasi *E. coli* pada media L-EMBA (B). Dugaan koloni yang dilakukan pengujian *multiplex-PCR* metode *one-run* (C) dari media TCBSA, M. Marker 100 bp, 1. Kontrol positif (*V. parahaemolyticus* ATCC 17802), 2. Kontrol negatif, 3 – 10. Koloni bakteri yang terindikasi *V. parahaemolyticus*. (D) Koloni dari media L-EMBA: M. Marker 100 bp, 1. Kontrol positif (*E. coli* ATCC 25922), 2. Kontrol negatif, 3 – 16. Koloni bakteri yang terindikasi *E. coli*.

Table 2. Jenis Sampel Produk Perikanan yang Dilakukan Isolasi pada Media TCBSA (*V. parahaemolyticus*) dan L-EMBA (*E.coli*).

No.	Jenis Sampel	Hasil Pengujian Koloni Menggunakan mPCR	
		<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>E.coli</i>
1.	<i>Litopenaeus vannamei</i>	3	7
2.	<i>Nemipterus nemathoporus</i>	1	1
3.	<i>Hoplostethus srtarcki</i>	1	-
4.	<i>Ephinephelus sp</i>	2	-
5.	<i>Sardina pilchardus</i>	-	1
6.	<i>Rastrellinger brachysoma</i>	-	4
7.	<i>Loligo sp</i>	-	4
8.	<i>Chanos chanos</i>	-	1
9.	<i>Caesio erythrogaster</i>	-	1
10.	<i>Euthynnus affinis</i>	-	1
11.	<i>Fenneropaneus merguensis</i>	-	1
12.	<i>Lutjanus sp.</i>	-	1
13.	<i>Lethrinus atkinsoni</i>	-	2
14.	<i>Selaroides leptolepis</i>	-	1
15.	<i>Trichiurus lepturus</i>	-	1
16.	<i>Caragoides sp.</i>	-	1
17.	<i>Aurigequula fasciata</i>	-	1
18.	<i>Thunnus thunnus</i>	-	3
19.	<i>Epinephelus sp.</i>	-	4
20.	<i>Thunnus alalunga</i>	-	2
21.	<i>Trichiurus lepturus</i>	-	1

*parahaemolyticus* dan *E. coli* (Tabel 2) berasal dari jenis produk seperti udang, ikan kurisi, ikan kerapu, cumi-cumi, frozen tuna, fresh pelagi, frozen pelagic, frozen demersal, frozen tuna dan lainnya. Dari hasil mPCR *one-run* menunjukkan sampel dominan terkontaminasi bakteri *V. parahaemolyticus* dan *E. coli* berasal dari sampel jenis udang.

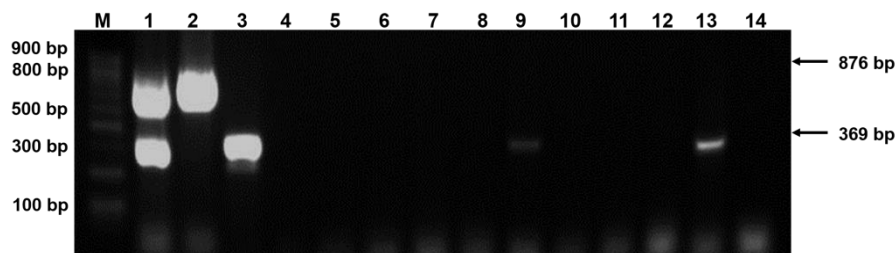
*Aplikasi langsung mPCR (one-tube) Pada Sampel Udang*

Hasil pengujian mPCR (*one-tube*) menunjukkan sampel jenis udang merupakan sampel yang paling banyak terkontaminasi kedua jenis bakteri tersebut, sehingga pengujian mPCR *one-tube* dilakukan pada sampel udang. Aplikasi

mPCR *one-tube* pada sampel udang berjenis *Litopenaeus vannamei* sesuai dengan metode yang telah dijelaskan diatas. Dari hasil aplikasi mPCR *one-tube* pada sampel *Litopenaeus vannamei* memperoleh hasil positif PCR *V. parahaemolyticus* pada sampel no. 6 dan 9 (Gambar 4), dan tidak ditemukan adanya positif *E. coli* pada sampel udang tersebut.

**Pembahasan**

Hasil optimasi metoda mPCR *one-tube* didapatkan suhu annealing 58°C efektif digunakan untuk mendeteksi bakteri *V. parahaemolyticus* dan *E. coli* dalam satu kali proses amplifikasi yang sama dengan nilai sensitifitas hingga konsentrasi DNA 5,6 pg/mL



Gambar 4. Hasil amplifikasi sampel udang (*Litopenaeus vannamei*) menggunakan multiplex-PCR metode *one-tube*. menggunakan media TSB: M. Marker, 1. Kontrol positif yang dicampur (*V. parahaemolyticus* ATCC 17802 dan *E. coli* ATCC 25922); 2. Kontrol positif *E. coli* ATCC 25922, 3. Kontrol positif *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, 4. Kontrol negatif, 5 – 14. Sampel udang No. 1 – 10.



(2,1 CFU/mL) dan konsentrasi DNA 5,5 pg/mL (4,65 CFU/mL), secara berurutan. Sedangkan metoda mPCR *one-tube* mampu mendeteksi hingga konsentrasi DNA 0,771 ng/mL. Primer *irgB* dan *lacZ* spesifik terhadap bakteri target dan tidak menghasilkan produk PCR pada bakteri non-target. Metoda mPCR *one-tube* mampu mendeteksi 7 koloni positif bakteri *V. parahaemolyticus* dari 96 koloni yang terisolasi berwarna hijau di media TCBSA dan 38 koloni positif *E.coli* dari 52 koloni yang diisolasi dari media L-EMBA. Sedangkan untuk metode PCR *one-tube* hanya mampu mendeteksi 2 sampel langsung dari udang.

Pengembangan mPCR dimulai dengan proses pemilihan primer yang tepat (Sahu *et al.*, 2019) dan optimalisasi suhu *annealing* yang optimal berada pada 54 – 58 °C (Wang *et al.*, 2019). Aplikasi mPCR harus memiliki sensitifitas serendah mungkin dalam total DNA dan spesifik pada target gen yang dihasilkan. Metode mPCR *one-tube* mampu mendeteksi *V. parahaemolyticus* hingga konsentrasi DNA 5,6 pg/mL pada kepadatan bakteri 2,1 CFU/ml. Nilai yang dihasilkan dari penelitian ini lebih sensitif dari mPCR *V. parahaemolyticus* dengan target gen *toxR* dan *tdh* yaitu 20 pg pada 3,7 CFU (Malcolm *et al.*, 2015) Sensitifitas dalam mengidentifikasi *E. coli* pada konsentrasi DNA 5,5 pg/mL dengan kepadatan 4,65 CFU/mL, nilai sensitifitas yang dihasilkan tidak jauh berbeda dengan penelitian sebelumnya dengan target gen *fliC* yang menunjukkan batas deteksi *E. coli* hingga 1 pg/mL (Kim *et al.*, 2014).

Penurunan nilai sensitifitas didapatkan pada metoda mPCR *one-tube* yang hanya mampu mendeteksi pada konsentrasi DNA 0,771 ng/mL. Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh (Nguyen *et al.*, 2016) yaitu *one-tube* multiplex PCR pada jenis bakteri *E. coli*, *S. enterica*, dan *L. monocytogenes* menunjukkan adanya penurunan kualitatif intensitas produk PCR hanya mencapai 10<sup>2</sup> CFU/mL. Hasil penelitian lain menggunakan metode *one-tube* multiplex PCR pada 6 bakteri patogen oleh (Wang *et al.*, 2019) menunjukkan batas deteksi identifikasi bakteri *E. coli*, *P. multocida*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *Salmonella spp.* dan *S. aureus* hanya mampu mendeteksi sampai dengan konsentrasi 500 pg/ml. Hal ini mengindikasikan

adanya penurunan nilai sensitifitas mPCR dengan peningkatan jumlah target gen yang diuji, berdasarkan jumlah perbedaan primer.

Ketepatan pemilihan target gen dalam menentukan primer yang digunakan menjadi aspek penting dalam pengembangan pengujian mPCR *V. parahaemolyticus* dan *E. coli* untuk menjaga keamanan hasil produk perikanan, agar tidak terjadi kesalahan persepsi., Deteksi bakteri *V. parahemolyticus* secara spesifik dapat dilakukan menggunakan gen *irgB* dan *groEL* (Hossain *et al.*, 2013) sedangkan target gen lain seperti *tdh*, *tlh*, *trh*, *gyrB*, *toxR* dan *fragmen pR72H* hanya mendeteksi gen toksin dan tidak memiliki spesifitas yang baik karena masih ditemukannya hasil PCR positif dan negatif palsu (Hossain *et al.*, 2013; Thi *et al.*, 2021).

Penggunaan primer *lacZ* dari strain *E. coli* juga dilakukan untuk mendeteksi secara spesifik bakteri *E. coli* berdasarkan karakteristik yang dimiliki bakteri *E.coli* dengan menghasilkan enzim  $\beta$ -Galactosidase yang mereaksikan laktosa didalam tubuh manusia (Zhang *et al.*, 2012) oleh bakteri usus (Isfahani *et al.*, 2017). Target gen *lacZ* memberikan efisiensi yang baik dalam mendeteksi bakteri *E. coli* dan coliform (Molina *et al.*, 2015). Target gen lain yang digunakan untuk mendeteksi *E. coli* yaitu *stx1*, *stx2*, *bfpA*, *eae*, *lt*, *st*, *ial* dan *ipaH* hanya mengkhusus untuk mendeteksi strain *E. coli* yang memiliki patogenitas (Fialho *et al.*, 2013). Berdasarkan kondisi tersebut primer yang digunakan untuk mendeteksi target gen *lacZ* digunakan dalam penelitian ini untuk mendeteksi keberadaan bakteri *E. coli* secara spesifik.

Aplikasi mPCR *one-tube* pada sampel udang berjenis *Litopenaeus vannamei* memperoleh hasil positif PCR *V. parahaemolyticus* pada sampel no. 6 dan 9 (Gambar 4), dan tidak ditemukan adanya positif *E. coli* pada sampel udang tersebut. Bakteri *V. parahaemolyticus* dan *E. coli* merupakan bakteri patogen yang harus dikendalikan dalam standar keamanan pangan (Alwy, 2017). Kasus yang disebabkan oleh bakteri *V. parahaemolyticus* yaitu *gastroenteritis* ditandai diare akut, infeksi luka, septicemia hingga kematian (Li *et al.*, 2016; Lopatek *et al.*, 2018). Komponen hemolitik seperti *thermostable direct hemolysin*, *thermolabile direct hemolysin*, *phospholipase*, dan *lysophospholipase*



dimiliki oleh bakteri *V. parahaemolyticus* bersifat invasive hingga pada jantung, hati, pankreas dan limfa (Bintsis, 2017).

Mekanisme patogenitas bakteri *E. coli* dikategorikan dalam 4 golongan yaitu: EPEC (*Enteropatogenik Escherichia coli*) dan ETEC (*Enterotoksigenik Escherichia coli*) yang menyebabkan infeksi pada usus kecil dan menimbulkan diare, EIEC (*Enteroinvasif Escherichia coli*) menyebabkan diare berdarah dan berlendir, sedangkan EHEC (*Enterohemoragik Escherichia coli*) yang menyebabkan diare akut dan sindrom hemolitik orekik pada manusia (Sartika, 2018). Adapun mekanisme patogen lain dari *E. coli* yaitu *Enteroaggregatif E. coli* (EAGGEC) dan *Attaching and Effacing E. coli* (AEEC) (Bintsis, 2017).

Ancaman keberadaan bakteri patogen pada produk hasil perikanan menjadikan produk perikanan diwajibkan memiliki standar keamanan yang harus dipenuhi berdasarkan UU No. 31 tahun 2004 dan Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan No. 52A Tahun 2013. Pengolah produk perikanan memiliki kewajiban untuk menerapkan pengendalian mutu dan keamanan hasil perikanan melalui penerapan sanitasi dan cara pengolahan produk perikanan yang baik melalui sertifikasi standar keamanan pangan sebelum dipasarkan (Alwy, 2017). Mikroba pencemar dapat mengkontaminasi produk perikanan mulai dari tahap penanganan, pengolahan, pemasaran hingga penanganan sebelum dikonsumsi dalam bentuk produk olahan segar atau beku (de Lira *et al.*, 2020). Penanganan ikan pasca penangkapan dikapal oleh nelayan menjadi titik kritis kualitas ikan (Lailossa, 2015), serta kesalahan dalam proses penyimpanan dan penanganan dapat meningkatkan pertumbuhan bakteri pada produk perikanan (Elhadi *et al.*, 2016). Penerapan skema HACCP yang dilakukan melalui tahap pengendalian, monitoring dan evaluasi proses pengolahan dan pemasaran produk hasil perikanan sangat penting dilakukan dengan tujuan meningkatkan keamanan produk sebelum konsumsi (Herdiana, 2015). Waktu yang dibutuhkan untuk mengidentifikasi *V. parahaemolyticus* dan *E. coli* menggunakan metode konvensional membutuhkan waktu 7 – 8 hari sesuai dengan SNI 01-2332.5-2006 dan SNI

2332:1:2015, secara berurutan. Ini menyebabkan penurunan kualitas produk selama menunggu waktu pengujian. Sehingga metode mPCR dapat mempersingkat waktu sampai dengan 4 hari dengan tidak meninggalkan kaidah dari metode konvensional kedua SNI tersebut. Sehingga metode mPCR ini menjadi metode terbaru dalam mendeteksi bakteri dalam menjaga keamanan dari produk perikanan.

### Kesimpulan

Keberhasilan aplikasi mPCR mendeteksi *V. parahaemolyticus* dan *E. coli* lebih cepat dan akurat pada produk perikanan merupakan metode yang dibutuhkan dalam pengujian jumlah sampel yang besar berskala laboratorium. Metode mPCR hanya membutuhkan waktu 3 hari dalam mendeteksi bakteri *V. parahaemolyticus* dan *E. coli* dengan tetap mempertahankan tahapan pengkayaan dan standar pengujian bakteri tersebut sesuai SNI. Aplikasi mPCR yang memberikan efektifitas dan efisiensi dari sisi waktu, biaya dan tenaga, sehingga metode ini dapat mempertahankan kualitas mutu dan keamanan produk perikanan. Aplikasi mPCR dapat menjadi kandidat baru dalam mendeteksi dini dan mengidentifikasi bakteri keamanan pangan dalam pemenuhan standar keamanan produk hasil perikanan tujuan ekspor dan pasar domestik.

### Ucapan Terima kasih

Kami mengucapkan terima kasih kepada *Center for Animal Disease Control (CADIC), University of Miyazaki, Jepang* dalam membantu penyediaan bahan baku biologi molekuler dan alat vakum yang digunakan dalam penelitian ini. Selain itu juga kami mengucapkan terima kasih kepada Balai KIPM Denpasar yang telah menyediakan fasilitas dalam penelitian ini.

### Daftar Pustaka

- Alwy, F. (2017). Indonesian Fisheries Policy Reform : Compliance with Stringent Food Safety Requirement Of Importing Countries B . Discussion. *Fiat Justisia Jurnal Ilmu Hukum*, 11(2), 150–172.
- Bintsis, T. (2017). Foodborne pathogens. *AIMS Microbiology*, 3(June), 529–563. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.3.529>

- Chen, X., Zhu, Q., Yu, F., Zhang, W., Wang, R., Ye, X., Jin, L., Liu, Y., Li, S., & Id, Y. C. (2018). Serology , virulence and molecular characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seafood in Zhejiang province. *PLOS One*, 1–9.
- de Lira, A. D., de Castro, I. M. S., Mann, M. B., Mallmann, L. P., Kothe, C. I., Varela, A. P. M., Frazzon, A. P. G., & Frazzon, J. (2020). Evaluating *Sardinella brasiliensis* quality indicators through the quantification of histamine and bacterial communities. *Heliyon*, 6(8), e04461. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04461>
- Elhadi, N., Aljeldah, M., & Aljindan, R. (2016). Microbiological contamination of imported frozen fish marketed in Eastern Province of Saudi Arabia. *International Food Research Journal*, 23(December), 2723–2731. <http://www.ifrj.upm.edu.my>
- Fakruddin, M. ., Sultana, M., Ahmed, M. ., Chowdhury, A., & Chowdhury, N. (2013). Multiplex PCR (Polymerase Chain Reaction ) Assay for Detection of *E.coli* O157:H7, *Salmonella* sp., *Vibrio cholerae* dan *Vibrio parahaemolyticus* in Spiked Shrimps (*Panaeus monodon*). *Pakistan Journal Of Biological Sciences*, 16(6), 267–274. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2013.267.274>
- Fialho, O. B., Souza, E. M. De, Dallagassa, C. D. B., Pedrosa, D. O., Klassen, G., Irino, K., Paludo, K. S., Assis, D., Surek, M., Ara, E., Souza, M. De, Farah, S., & Fadel-picheth, C. M. T. (2013). Detection of Diarrheagenic *Escherichia coli* Using a Two-System Multiplex-PCR Protocol. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 161(January), 155–161. <https://doi.org/10.1002/jcla.21578>
- Herdiana, D. . (2015). Sardines product quality control in terms of HACCP to improve food security in Blambangan Foodpacker Indonesia company limited , Banyuwangi. *International Food Research Journal*, 22(4), 1507–1512.
- Hossain, M. T., Kim, Y. O., & Kong, I. S. (2013). Multiplex PCR for the detection and differentiation of *Vibrio parahaemolyticus* strains using the *groEL*, *tdh* and *trh* genes. *Molecular and Cellular Probes*, 27(5–6), 171–175. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2013.04.001>
- Hu, L., Han, B., Tong, Q., & Cao, D. (2020). Detection of Eight Respiratory Bacterial Pathogens Based on Multiplex Real-Time PCR with Fluorescence Melting Curve Analysis. *Canadian Journal of Infectious Disease and Medical Microbiology*, 2020, 1–11. <https://doi.org/doi.org/10.1155/2020/2697230>
- Isfahani, B. N., Fazeli, H., Babaie, Z., Poursina, F., Moghim, S., & Rouzbahani, M. (2017). Evaluation of Polymerase Chain Reaction for Detecting Coliform Bacteria in Drinking Water Sources. *Advanced Biomedical Research*, 1–3. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.216783>
- Jiang, Y., He, L., Wu, P., Shi, X., Jiang, M., Li, Y., & Lin, Y. (2017). Simultaneous Identification of Ten Bacterial Pathogens Using the Multiplex Ligation Reaction Based on the Probe Melting Curve Analysis. *Scientific Reports*, June, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06348-z>
- Kim, J., Rhim, S., Kim, K., Paik, H., & Lee, J. (2014). Simultaneous Detection of *Listeria monocytogenes* , *Escherichia coli* O157 : H7 , *Bacillus cereus* , *Salmonella* spp ., and *Staphylococcus aureus* in Low-fatted Milk by Multiplex PCR. *Korean Society for Food Science of Animal Resources*, 34(5), 717–723.
- Kongchum, P., Chimtong, S., Chareansak, N., & Subprasert, P. (2016). Effect of Green Tea Extract on *Vibrio parahaemolyticus* Inhibition in Pacific White Shrimp ( *Litopenaeus vannamei* ) Postlarvae. *Italian Oral Surgery*, 11, 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2016.12.020>
- Lailossa, G. W. (2015). Preliminary Study , Risk Analysis and HACCP in Cold

- Chain System , Frozen Yellow Fin Tuna in Moluccas. *Journal of Agricultural Studies*, 3(2), 248–257. <https://doi.org/10.5296/jas.v3i2.8208>
- Li, J., Xue, F., Yang, Z., Zhang, X., Zeng, D., Chao, G., Jiang, Y., & Li, B. (2016). *Vibrio parahaemolyticus* strains of pandemic serotypes identified from clinical and environmental samples from Jiangsu, China. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAY), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00787>
- Lopatek, Magdalena. Wieczorek, Kinga. Osek, J. (2018). Antimicrobial Resistance, Virulence Factors, and Genetic Profiles of *Vibrio parahaemolyticus* from Seafood. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(16), 1–10. <https://doi.org/10.1128/AEM.00537-18>.
- Luhur, E. S., Mulatsih, S., & Puspitawati, E. (2019). Competitiveness Analysis of Indonesian Fishery Products in The ASEAN and Canada Markets. *Signifikan: Jurnal Ilmu Ekonomi*, 8(1), 105–120.
- Malcolm, T. T. H., Cheah, Y. K., Radzi, C. W. J. W. M., Kasim, F. A., Kantilal, H. K., Huat John, T. Y., Martinez-Urtaza, J., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M., & Son, R. (2015). Detection and quantification of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish by using multiplex PCR and loop-mediated isothermal amplification assay. *Food Control*, 47, 664–671. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.08.010>
- Miar, Firmansyah, Oktavilia, S., Puspita, D. W., & Prayogi, R. (2020). Fisheries industry strategy in Indonesia. *Earth and Environmental Science*, 1–7. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/530/1/012015>
- Molina, F., López-acedo, E., Tabla, R., Roa, I., Gómez, A., & Rebollo, J. E. (2015). Improved detection of *Escherichia coli* and coliform bacteria by multiplex PCR. *BMC Biotechnology*, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12896-015-0168-2>
- Mustafa, H., Rachmawati, I., & Udin, Y. (2016). Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA Genom Nyamuk *Anopheles barbirostris* Genomic DNA Concentration and Purity Measurement of *Anopheles barbirostris*. *Jurnal Vektor Penyakit*, 10(1), 7–10.
- Nguyen, T. T., Giau, V. Van, & Vo, T. K. (2016). Multiplex PCR for simultaneous identification of *E. coli* O157 : H7 , *Salmonella* spp . and *L. monocytogenes* in food. *3 Biotech*, 6(2), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0523-6>
- Nurilmala, M., Saputri, N. N., Abdullah, A., Nurjanah, N., Yusfiandayani, R., & Sondita, M. F. A. (2020). Detection of histamine-producing bacteria on tuna species using histidine decarboxylase (Hdc) and 16s rRNA. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*, 15(3), 131–139. <https://doi.org/10.15578/squalen.v15i3.445>
- Raudiah, Prasetyo, E., Farida, & Sudarto, T. (2021). Identifikasi Bakteri Patogen Pada Ikan Ringau (*Datnioides microlepis*) yang di Lalulintaskan di Stasiun Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Pontianak. *JURNAL RUAYA*, 9(2).
- Sahu, B., Singh, S. D., Behera, B. K., Panda, S. K., & Das, A. (2019). Rapid detection of *Salmonella* contamination in seafoods using multiplex PCR. *Brazilian Journal of Microbiology*, 807–816.
- Sartika, D. (2018). *Cemaran Bakteri Patogen Pada Pangan (Uji Kualitatif dan Kuantitatif)* (Pertama). Graha Ilmu.
- Schmidt, W., Evers-king, H. L., Campos, C. J. A., Jones, D. B., Miller, I., Davidson, K., & Shutler, J. D. (2018). A generic approach for the development of short-term predictions of *Escherichia coli* and biotoxins in shellfish. *Europe PMC Funders Group Europe PMC Funders Author Manuscripts*, 173–185. <https://doi.org/10.3354/aei00265.A>
- Thi, P., Yen, H., Linh, N. Q., Duy, N., & Tram, Q. (2021). The identification and determination of toxin genes of *Vibrio* strains causing hemorrhagic disease on red drum (*Sciaenops ocellatus*) using PCR.



- AMB Express*. <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01161-w>
- Wang, Z., Zuo, J., Gong, J., Hu, J., Jiang, W., Mi, R., Huang, Y., Chen, Z., Phouthapane, V., Qi, K., Wang, C., & Han, X. (2019). Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous and rapid detection of six pathogenic bacteria in poultry. *AMB Express*, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0908-0>
- Yang, X., Wisuthiphaet, N., Young, G. M., & Nitin, N. (2020). Rapid detection of *Escherichia coli* using bacteriophage-induced lysis and image analysis. *PLoS ONE*, 15(6 June), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233853>
- Zhang, W., Wang, C., Huang, C. Y., Yu, Q., Liu, H. C., Zhang, C. W., & Pei, X. F. (2012). Construction and Secretory Expression of  $\beta$ -Galactosidase Gene from *Lactobacillus Bulgaricus* in *Lactococcus Lactis*. *Biomedical and Environmental Sciences*, 25(2), 203–209. <https://doi.org/10.3967/0895-3988.2012.02.012>