

DESAIN PRIMER SPESIFIK UNTUK DETEKSI DINI PENYAKIT VIBRIOSIS PADA UDANG PENAEID

Ince Ayu Khairana Kadriah^{*)}, Endang Susianingsih^{*)}, Sukenda^{**)},
Munti Yuhana^{**)}, dan Enang Harris^{**)}

^{*)} Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Payau
Jl. Makmur Dg. Sitakka No. 129, Maros 90512, Sulawesi Selatan
E-mail: *e_sisy@yahoo.com*

^{**)} Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan,
Institut Pertanian Bogor
Jl. Rasamala, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

(Naskah diterima: 13 Juli 2012; Disetujui publikasi: 28 Februari 2013)

ABSTRAK

Serangan *Vibriosis*, yang disebabkan oleh *Vibrio harveyi* berpendar pada budidaya udang telah menyebabkan penurunan yang signifikan dalam produksi, baik pada pembenihan maupun di tambak pembesaran. Pengembangan metode deteksi cepat berbasis PCR (*Polymerase Chain Reaction*) sangat penting untuk mencegah penularan vibriosis. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengembangkan metode cepat deteksi vibriosis pada udang penaeid dengan menggunakan penanda molekuler yang spesifik. PCR berbasis deteksi gen spesifik dilakukan menggunakan primer spesifik *toxR*, *haemolysin (vvh)*, dan *gyrB*. Dari 35 isolat, 22 isolat yang terdeteksi memiliki gen spesifik *toxR*, *haemolysin (vvh)* dan gen *gyrB* dan 9 isolat terdeteksi memiliki dua gen tertentu. Penanda molekuler spesifik telah dirancang menggunakan data urutan gen penyandi protein *haemolysin* dan *gyrase*. Desain pasangan primer yang didasarkan pada program perangkat lunak dari Primer3 dan secara manual menggunakan program perangkat lunak Bioedit. Tiga pasangan primer untuk gen *haemolysin* dan dua primer *gyrase* telah diperoleh dan dipilih sebagai primer.

KATA KUNCI: vibriosis, udang penaeid, PCR, deteksi cepat, penanda molekuler spesifik

ABSTRACT: *Specific primer design for rapid detection of Vibriosis on penaeid shrimp. By: Ince Ayu Khairana Kadriah, Endang Susianingsih, Sukenda, Munti Yuhana, and Enang Harris*

Vibriosis occurrences, due to luminous Vibrio harveyi, on shrimp culture may caused substantial declines in production, either in hatcheries or in grow out ponds. Development of Polymerase Chain Reaction (PCR)-based rapid detection methods is very crucial in preventing vibriosis outbreaks. The aims of this study was to develop rapid methods of detection of the vibriosis in penaeid shrimp by using specific molecular markers. PCR-based detection of specific genes were performed employing specific primers of toxR, haemolysin (vvh) and gyrB. Out of the 35 isolates, 22 isolates were detected to have toxR, haemolysin (vvh) and gyrB specific genes and 9 isolates have two out of these specific genes. Specific markers have been designed using sequence data of the genes encoding the haemolysin protein and gyrase. Primer pairs design were based on the software program of Primer3 and manually aligned

by using Bioedit software program. Three of primer pairs for haemolysin gene and two of *gyrase* primers were obtained and selected as primer.

KEYWORDS: *vibriosis, penaeid shrimp, PCR, rapid detection, specific molecular marker*

PENDAHULUAN

Kementerian Kelautan dan Perikanan masih menempatkan udang sebagai komoditas unggulan perikanan budidaya selama 2010-2014. Selama periode 2010-2014 produksi udang diharapkan meningkat 74,75% atau dari 400 ribu ton menjadi 699 ribu ton yang terdiri atas udang vaname dan udang windu. Industri budidaya udang windu secara intensif dan transportasi udang windu ke seluruh dunia melalui perdagangan diketahui berhubungan erat dengan meningkatnya kejadian infeksi penyakit yang menyerang udang windu selama dua dekade ini (Saulnier *et al.*, 2000). Bakteri vibrio berpendar adalah salah satu penyebab penyakit yang cukup banyak menyerang hewan budidaya seperti udang (Baticados *et al.*, 1990; Karunasagar *et al.*, 1994; Moriarty, 1998; Zhang & Austin, 2000), beberapa spesies ikan dan kekerangan (Austin & Zhang, 2006) bahkan juga karang (Ben-Haim *et al.*, 2003) di seluruh dunia.

Pengembangan metode deteksi cepat, tepat, akurat dan murah sangat bermanfaat karena dapat digunakan dalam upaya pencegahan penyakit *vibriosis* di lapangan baik di panti benih maupun pada pembesaran udang di tambak. Upaya pencegahan ini harus dilakukan sebelum koloni bakteri mencapai *quorum*. Penelitian yang dilakukan oleh Defoirdt (2007) menyimpulkan bahwa kemampuan bakteri *vibrio* untuk melakukan *quorum sensing* sangat dipengaruhi oleh populasi bakteri tersebut di alam. Upaya untuk deteksi cepat secara molekular salah satunya dengan mengisolasi gen spesifik yang dimiliki oleh bakteri *vibrio* berpendar dan digunakan sebagai penanda molekular dalam diagnosis cepat untuk penyakit *vibriosis* berpendar (kuning-kuning) pada budidaya udang.

Gen *haemolysin* diketahui merupakan gen spesifik yang dimiliki bakteri *Vibrio* berpendar. Gen *haemolysin* adalah gen yang bertanggung jawab pada penghancuran membran sel darah atau proses hemolisis. Gen yang mengkode *haemolysin* ini dilaporkan ditemukan pada beberapa spesies bakteri di antaranya

adalah *V. harveyi* (Nishibuchi *et al.*, 1990; Nishibuchi & Kaper, 1995; Zhang *et al.*, 2001) dan *V. parahaemolyticus* (Bej *et al.*, 1999).

Selain gen *haemolysin* gen *toxR* yang secara spesifik mengkode protein transmembran juga memegang peranan penting pada regulasi gen toksin *ctx* dan beberapa gen-gen toksin lainnya. Gen *toxR* akan mengaktifkan gen-gen lainnya untuk menghasilkan toksin (Pang *et al.*, 2006). Gen *gyrB* diketahui berperan untuk mengkode protein subunit B dari DNA *gyrase* (*topoisomerase* type II). DNA *gyrase* mengatur superkoiling pita ganda DNA. Gen *gyrB* sangat diperlukan untuk replikasi DNA di mana gen ini berperan dalam pembentukan protein yang mengkode enzim *gyrase*.

Pendekatan yang memanfaatkan kemajuan bioinformatika dan teknik PCR dapat digunakan untuk mengembangkan penanda spesifik tersebut. Metode PCR digunakan untuk mengamplifikasi sekuen spesifik dari rantai DNA. Primer rantai pendek oligonukleotida yang didesain akan berkomplemen dengan masing-masing ujung dari daerah target pada rantai DNA dan kemudian memperpanjangnya pada sisi yang berlawanan dari DNA *template*. Karena fungsi primer sebagai inisiator sekaligus pembatas daerah yang akan diamplifikasi, maka idealnya primer memiliki urutan basa nukleotida yang tepat berpasangan dengan urutan basa DNA target yang akan diamplifikasi, dan tidak menempel di bagian lainnya. Desain primer yang bagus merupakan hal esensial bagi keberhasilan reaksi PCR.

Untuk mendesain suatu primer memerlukan data-data sekuen gen yang menyandikan protein sejenis dengan gen yang akan diamplifikasi melalui PCR. Data-data sekuen gen dapat diperoleh pada basis data gen dari lembaga-lembaga penyedia informasi gen dan protein atau hasil sekuen gen tertentu yang bersifat spesifik yang telah dihasilkan. Proses amplifikasi dari gen-gen yang mengkode sifat-sifat tertentu utamanya sifat patogen dapat menjadi suatu pendekatan baru dalam metode deteksi cepat penyakit (Cunningham, 2002).

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kesehatan Ikan dan Lingkungan Balai Penelitian dan Pengembangan Perikanan Budidaya Air Payau, Maros. Analisis sekuensing dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi UNIKA Atmajaya, Jakarta dan Laboratorium 1st Base Singapura. Tahapan Penelitian terdiri atas:

Isolasi Bakteri *Vibrio* Patogen dari Panti Benih dan Tambak Udang Windu

Sampel bakteri dan udang windu dikoleksi dari tambak percobaan Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Payau, Maros di Maranak dan Takalar serta tambak-tambak udang windu di Barru, Pangkep, Pinrang, Banyuwangi, dan Bali. Bakteri diisolasi dari air tambak, sedimen tambak, dan udang sakit. Sampel air diambil dengan menggunakan botol steril kemudian dibawa ke laboratorium. Sedangkan sampel sedimen diambil menggunakan sudip steril dan dibawa ke laboratorium menggunakan botol steril. Isolasi bakteri dilakukan dengan cara mengambil 1 mL air sampel dan 1 g sedimen tambak kemudian diencerkan secara bertingkat dalam larutan fisiologis (Benson, 1985) dan dikultur pada media TCBSA (*Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar*). Bakteri juga diisolasi dari hepatopankreas udang windu.

Deteksi Gen Spesifik pada Bakteri *Vibrio* Berpendar

Pada penelitian ini digunakan primer spesifik untuk mendeteksi gen-gen spesifik *toxR gene*, *haemolysin (vvh) gene* dan *GyrB gene* dengan metode PCR (Tabel 1). Primer-primer ini digunakan untuk mendeteksi gen-gen spesifik pada isolat bakteri yang diisolasi dari tambak dan panti benih di berbagai daerah di Sulawesi Selatan dan Jawa.

Isolasi Genom Bakteri Kandidat

Metode yang digunakan dalam isolasi genom bakteri adalah metode *phenol-chloroform* yang dikembangkan oleh Parenrengi (2000). Bakteri dikultur di dalam *nutrient broth* selama empat jam kemudian dipanen dengan cara sentrifugasi. Sebanyak 1 mL biakan bakteri dipindahkan ke dalam tabung *ependorf* steril 1,5 mL dan disentrifugasi (6.000 rpm; 10 menit). Proses sentrifugasi diulang sebanyak dua kali dan kemudian dilakukan pencucian dengan larutan fisiologis juga dengan sentrifugasi.

Pelet bakteri yang dihasilkan kurang lebih 50 mg kemudian dicampur dengan 500 μ L *lysis buffer*, 20 μ L proteinase-K (stok 20 mg/mL), dan 40 μ L *sodium dodecyl sulfate* (SDS) 10%. Setelah itu, lisat bakteri diinkubasi dalam *waterbath* selama 1-3 jam pada suhu 55°C. Penambahan 12,5 μ L RNAse dilakukan sebelum lisat disimpan pada suhu ruang selama 15-30 menit. Selanjutnya ditambahkan Phenol: Chloroform:Isoamyl alcohol (PCIA 25:24:1) sebanyak 500 μ L. Tabung *ependorf* dihomogenkan dengan menggunakan mini *mixer* secara perlahan sampai homogen dan disimpan pada suhu ruang selama 10 menit. Selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama delapan menit. Lapisan paling atas diambil dan dipindahkan ke tabung *ependorf* baru dan dilakukan penambahan PCIA seperti sebelumnya.

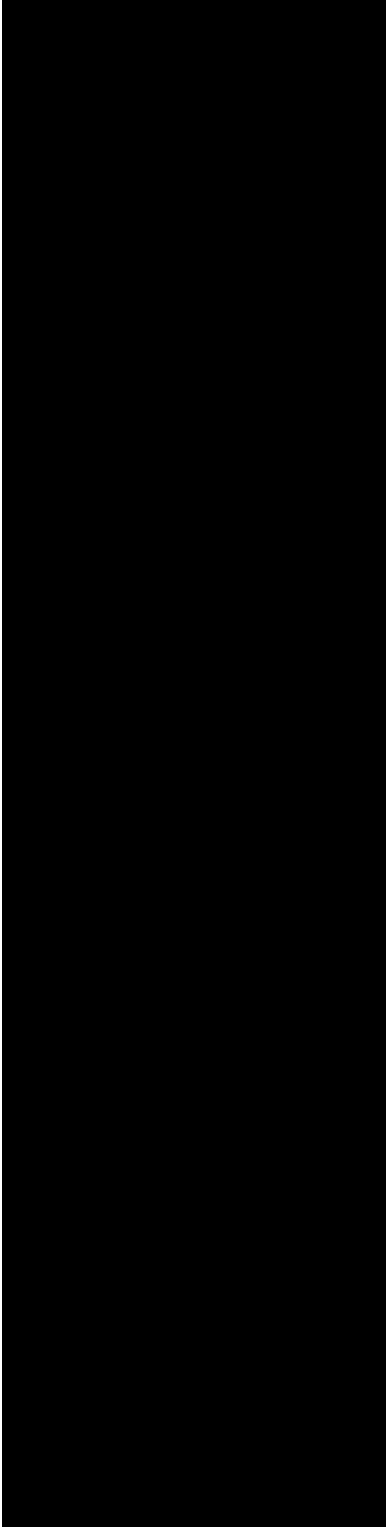
Setelah lapisan paling atas dipindahkan ke tabung *ependorf* baru, kemudian dilakukan penambahan satu bagian larutan Chloroform:Isoamyl alcohol (CIA 24: 1) dan disentrifugasi selama empat menit dengan kecepatan 13.000 rpm. Lapisan paling atas dipindahkan ke tabung *ependorf* baru. Kemudian ditambahkan dua bagian ethanol absolut dingin dan dicampur perlahan sampai homogen selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 6.000 rpm selama 30 menit. Cairan dibuang kemudian pelet DNA dicuci dengan 1 mL ethanol 70% kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 6.000 rpm selama 15 menit. *Pellet* DNA dikeringkan selama satu malam dan setelah kering ditambahkan 100 μ L *Buffer Tris-Etilendiamin Tetra Acetic Acid* (EDTA) (TE) dan selanjutnya disimpan pada suhu -20°C sampai digunakan (Parenrengi, 2000).

Proses PCR

Deteksi gen spesifik dilakukan dengan melakukan amplifikasi DNA menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Proses PCR dilakukan menggunakan Kit PCR *Ready To Go* (RTG) dengan primer spesifik komersil yang sudah ada dan dilakukan optimasi pada beberapa tingkatan suhu *annealing*.

Proses ampifikasi DNA untuk primer *toxR* adalah sebagai berikut: larutan master mix dibuat dengan mencampur 20 μ L *aquadest* milliQ ke dalam 1 tube RTG (GE Healthcare UK Limited Little Chalfont Buckinghamshire, UK), kemudian ditambahkan masing-masing 1 μ L Primer *toxRR1* dan *toxRF1* (Pang *et al.*, 2006).

Tabel 1. Primer spesifik yang digunakan untuk mendeteksi keberadaan gen spesifik
Table 1. *Specific primers were used to detect the presence of specific genes*



Sumber (Source): Cano-Gomez et al. (2009)

Setelah larutan dihomogenkan selanjutnya dimasukkan *template* DNA sebanyak 3 µL. Kondisi proses amplifikasi untuk primer spesifik *toxR* diatur sebanyak 30 siklus pada suhu denaturasi 94°C selama satu menit, *annealing* 57°C selama satu menit dan elongasi 72°C selama satu menit serta tahap ekstra elongasi 72°C selama sepuluh menit pada mesin PCR (Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler). Proses amplifikasi DNA untuk primer spesifik *vvh* gen (*haemolysin*) diatur sebanyak 30 siklus pada suhu denaturasi 94°C selama satu menit, *annealing* 53°C selama satu menit dan elongasi 72°C selama satu menit (Conejero & Hedreyda, 2004). Sedangkan untuk amplifikasi gen *gyrB* proses PCR juga diatur sebanyak 30 siklus dengan suhu denaturasi 94°C selama satu menit, *annealing* 60°C selama satu menit dan elongasi 72°C selama dua menit serta tahap ekstra elongasi 72°C selama tujuh menit (Thaithongnum *et al.*, 2006).

Elektroforesis

Hasil PCR kemudian diaplikasikan pada gel agarosa 2% untuk diobservasi dan didokumentasikan. Elektroforesis minigel hanya optimum untuk pemisahan DNA berukuran kecil (ratusan bp hingga sekitar 10 kb). Proses elektroforesis menggunakan minigel yang dialiri listrik dengan voltase 150 V dan kuat ampere 70 waktu *running* selama 30 menit. Larutan yang digunakan adalah *buffer* elektroforesis yang diperlukan untuk menciptakan kondisi stabil selama proses berlangsung. Pada umumnya *buffer* yang digunakan berupa *Tris Aceticacid EDTA* (TAE) atau *Tris Boric EDTA* (TBE). Untuk pewarna gel digunakan red gel sebagai pengganti etidhium bromide yang sudah tidak dianjurkan lagi karena bersifat karsinogenik.

Desain Primer Spesifik

Gen-gen spesifik yang sudah berhasil diamplifikasi dengan primer terpublikasi kemudian dianalisis urutan basa DNA-nya dengan metode sekuensing. Hasil sekuensing ini menjadi rujukan untuk mendesain primer spesifik. Setelah hasil sekuensing sudah diperoleh selanjutnya adalah mengumpulkan sekuen gen target sebagai referensi. Sekuen referensi dapat diperoleh dari database GenBank di situs NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Sekuen referensi akan digunakan dalam uji BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) untuk mengetahui kemiripan sekuen gen yang dimiliki dengan sekuen dari

gen sejenis yang sudah terdeposit pada NCBI. Urutan basa dari gen target dalam format notepad dapat langsung diunduh setelah laman NCBI/BLAST/blastn suite terbuka. Tahapan selanjutnya adalah menentukan perangkat lunak yang akan digunakan untuk desain primer. Pada dasarnya sembarang daerah tertentu pada sekuen referensi dapat diambil untuk dijadikan primer, tanpa perlu bantuan perangkat lunak khusus. Namun pada penelitian ini digunakan bantuan perangkat lunak Primer3 Plus (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3>). Setelah *software* sudah berhasil diunduh, maka proses desain primer sudah dapat dimulai.

HASIL DAN BAHASAN

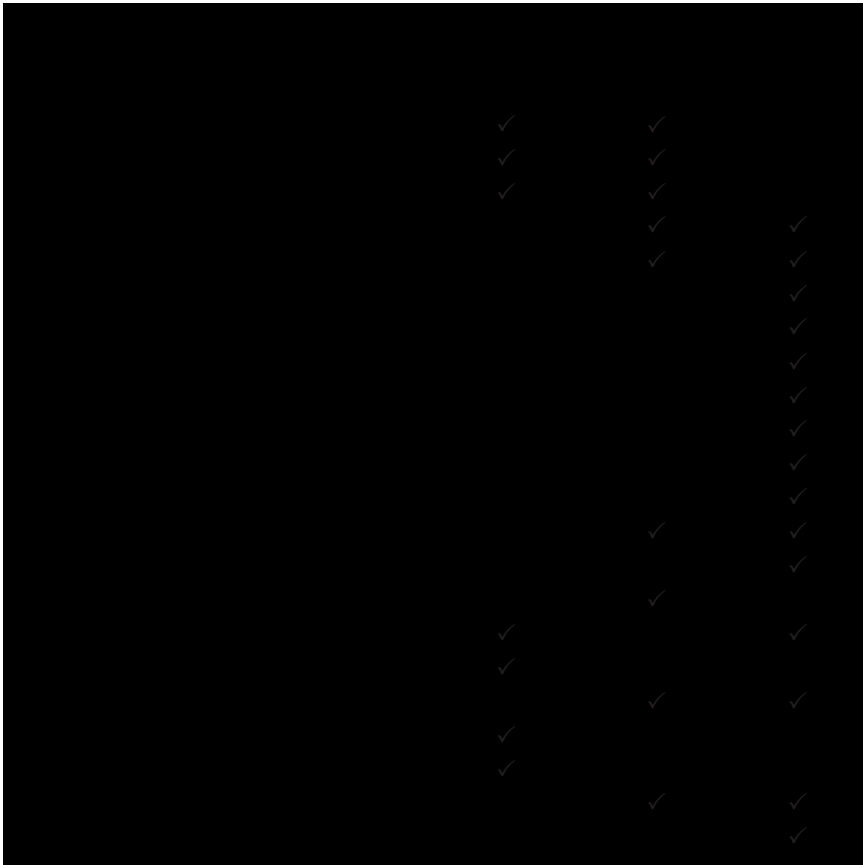
Hasil Deteksi Gen-Gen Spesifik pada *Vibrio* Berpendar

Dari 35 isolat yang diisolasi dari berbagai daerah, 22 isolat terdeteksi memiliki gen spesifik, di mana sembilan di antaranya terdeteksi memiliki dua gen spesifik (Tabel 2). Isolat bakteri yang memiliki gen spesifik ini kemudian diuji virulensinya dengan uji patogenisitas secara *in vivo* menggunakan hewan uji udang windu. Isolat kode 1, 120, 170, dan 275 terbukti memiliki tingkat patogenisitas lebih tinggi dibandingkan isolat bakteri *vibrio* berpendar lainnya (Tabel 2). Isolat yang memiliki tingkat patogenisitas tinggi kemudian dipilih untuk dikarakterisasi gen spesifik *haemolysin* dan *gyrase*-nya dengan proses sekuensing. Untuk gen spesifik *ToxR* tidak dapat disekuensing disebabkan hasil PCR yang divisualisasikan pada gel elektroforesis menunjukkan adanya penempelan yang tidak spesifik dari primer (*unspecific annealing*) sehingga tidak terbentuk pita tunggal DNA.

Haemolysin adalah eksotoksin yang bertanggung jawab dalam proses penyerapan membran eritrosit atau proses hemolisis sel darah. Gen yang mengkode *haemolysin* ini dilaporkan ditemukan pada beberapa spesies bakteri yang termasuk genus *vibrio* (Conejero & Hedreyda, 2004). Bakteri *vibrio* patogen yang memiliki gen *haemolysin* diketahui dapat menyebabkan terjadinya lisis pada sel darah inang.

Enzim *gyrase* terdistribusi hampir pada semua spesies dalam genus *vibrio*. Enzim ini yang mengurangi tekanan saat *double-stranded* DNA sedang tidak terikat oleh ikatan helikase hal ini menyebabkan terjadinya

Tabel 2. Hasil deteksi gen-gen spesifik bakteri *vibrio* berpendar
Table 2. The results of the detection of specific genes luminous **Vibrio**



superkoiling DNA. Banyak antibiotik bekerja dengan menyerang *gyrase*. *Gyrase* DNA bakteri hadir di prokariota dan beberapa eukariota, tetapi enzim ini tidak sepenuhnya mirip dalam struktur atau urutan, dan memiliki kedekatan yang berbeda untuk setiap molekul yang berbeda. Enzim ini tidak ditemukan pada manusia. Hal ini membuat *gyrase* sebagai target yang baik untuk antibiotik. Bakteri patogen memiliki struktur gen *Gyr-B* yang spesifik dibandingkan bakteri lainnya (Thaithongnum *et al.*, 2006).

Hasil Sekuensing Gen-Gen Spesifik *Vibrio* Berpendar

Hasil sekuensing gen *haemolysin* dari bakteri hasil koleksi menunjukkan kemiripan 94% dengan gen *haemolysin* bakteri *V. harveyi* yang terdeposit pada NCBI (Gambar 1).

Sedangkan hasil sekuensing gen *gyrase* memiliki kemiripan 99% dengan gen *gyrase* bakteri *V. harveyi* (Gambar 3). Kemiripan gen target yang diisolasi dibandingkan dengan beberapa sekuen referensi menentukan berhasil tidaknya isolasi gen spesifik. Jumlah sekuen referensi yang diperlukan tergantung dari sampel target. Semakin banyak referensi sekuen gen yang kita peroleh akan lebih baik agar kita dapat mendesain primer di daerah yang benar-benar sama (*conserved region*) setelah sekuen tersebut disejajarkan (*alignment*). Pada dasarnya satu data sekuen sudah dapat dijadikan referensi dengan syarat bahwa sampel target nantinya memiliki kesamaan spesies atau dengan kata lain secara genetik sangat mirip. Hasil sekuensing selanjutnya digunakan untuk mendesain primer spesifik bakteri *Vibrio* patogen.

Sekuen gen *haemolysin*

>1st_BASE_399953_1hem_VhF1

```
GTAGTGCTATACTACATTAATCTTGCTCCGCAGCCGACTCATCAGAGCCTTCTTACCTG
CTAAATGCCTCAGAAGTGAGAAGCGCACAAACAAAAGCAAACATACACCTACGTACGATG
CTGGTATCGAACTAGTTATTTCACATGATGACCCAGAAACCGACTGGGAGTGGGCAGAA
AATCCAGATGGCAGTTATTTCACTATCGAAGGCTATTGGTGAACGCACTCTCGTTTAA
AAACATGTTCTATACCAATACACCGCAAAGTGTTATCAAGCAAANCCATTNAG
```

BLAST

Basic Local Alignment Search Tool

[NCBI/ BLAST/ blastn suite/ Formatting Results - VM5G11FZ016](#)

Nucleotide Sequence (226 letters)

Query ID |cl|27053
Description None
Molecule type nucleic acid
Query Length 226

Database Name nr
Description All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
Program BLASTN 2.2.25+

Descriptions

Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [E](#) GEO [G](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map Viewer [P](#) PubChem [B](#) BioAssay

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
EU827170.1	<i>Vibrio harveyi</i> strain VH34 hemolysin gene, complete cds	346	346	100%	4e-92	94%	
AB271112.1	<i>Vibrio campbellii</i> vcamhly gene for hemolysin, complete cds, strain: 53	340	340	100%	2e-90	93%	
AB271111.1	<i>Vibrio campbellii</i> vcamhly gene for hemolysin, complete cds, strain: 53	340	340	100%	2e-90	93%	
AB271110.1	<i>Vibrio campbellii</i> vcamhly gene for hemolysin, complete cds, strain: 52	340	340	100%	2e-90	93%	
AB271109.1	<i>Vibrio campbellii</i> vcamhly gene for hemolysin, complete cds, strain: 41	340	340	100%	2e-90	93%	
DQ434995.1	<i>Vibrio campbellii</i> CAIM 519T hemolysin gene (vch), complete cds	335	335	100%	8e-89	93%	
DQ356918.1	<i>Vibrio campbellii</i> strain NBRC 15631 hemolysin (vch) gene, complete cds	335	335	100%	8e-89	93%	
CP000790.1	<i>Vibrio harveyi</i> ATCC BAA-1116 chromosome II, complete sequence	329	329	100%	4e-87	92%	
DQ434996.1	<i>Vibrio campbellii</i> hemolysin gene (vch), compete cds	329	329	100%	4e-87	92%	
DQ663484.1	<i>Vibrio campbellii</i> strain VIB 285 VHH/TLH hemolysin gene, partial cds	237	237	71%	2e-59	93%	

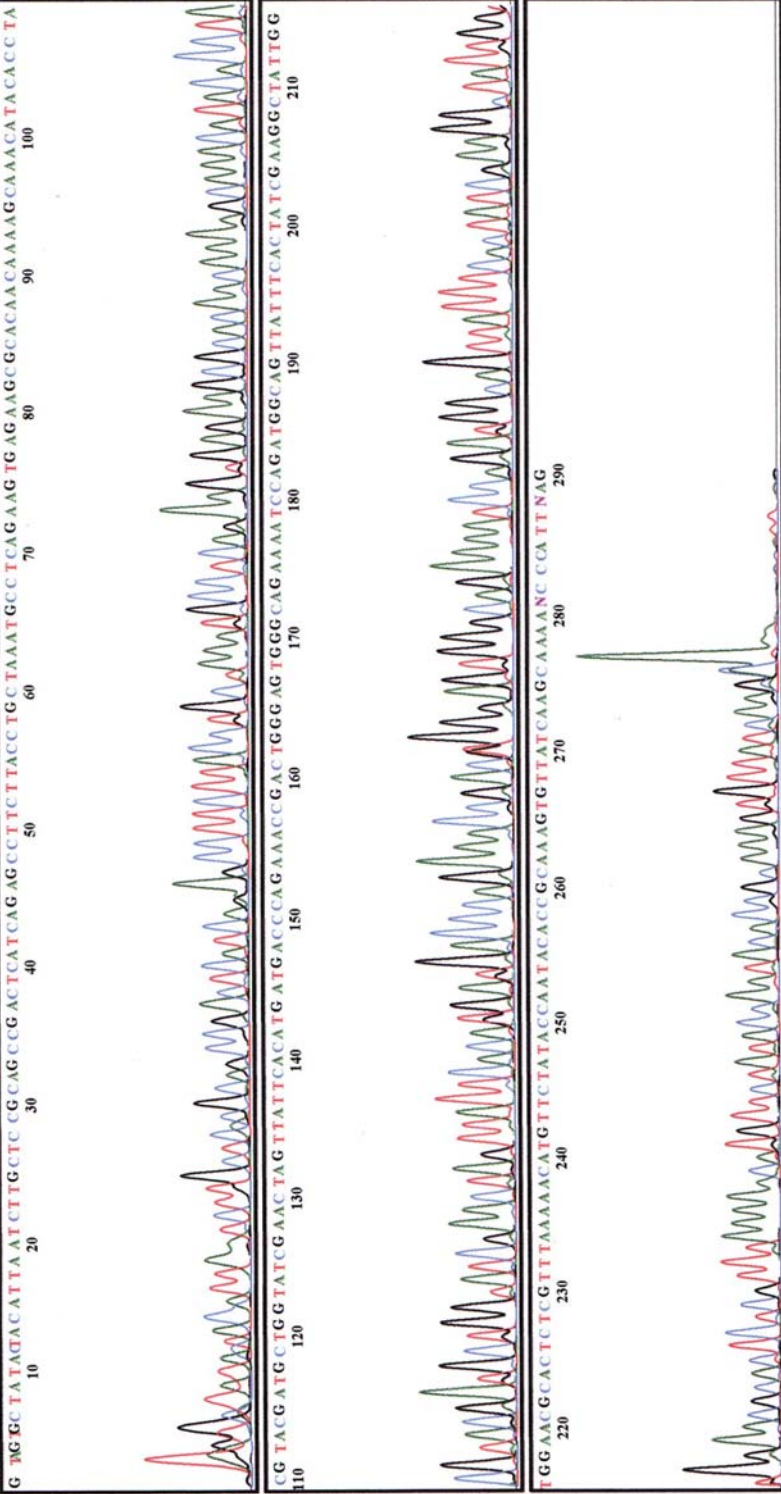
Gambar 1. Hasil sekuensing dan *alignment* gen *haemolysin*

Figure 1. Result of sequencing and alignment of *haemolysin* gene

Signal G:105 A:133 T:108 C:106
KB_3730_POP7_BDTV3.mob
?? no 'MTXF' field
Points 2042 to 16863

File: 1st_BASE_399953_1hem_VhF1.ab1
p
6258050-03 625805059552766616340570258005-00
Lane 15

Model 3730
KB.bcp
BioEdit, version 7.0.9.0 (6/27/07)




Gambar 2. Elektroforegram hasil sekuensing untuk gen *haemolysin*
Figure 2. Electroforegram of *haemolysin* gene sequencing result

Sekuen gen *gyrase*

>1st_BASE_399959_120_gyr_A2

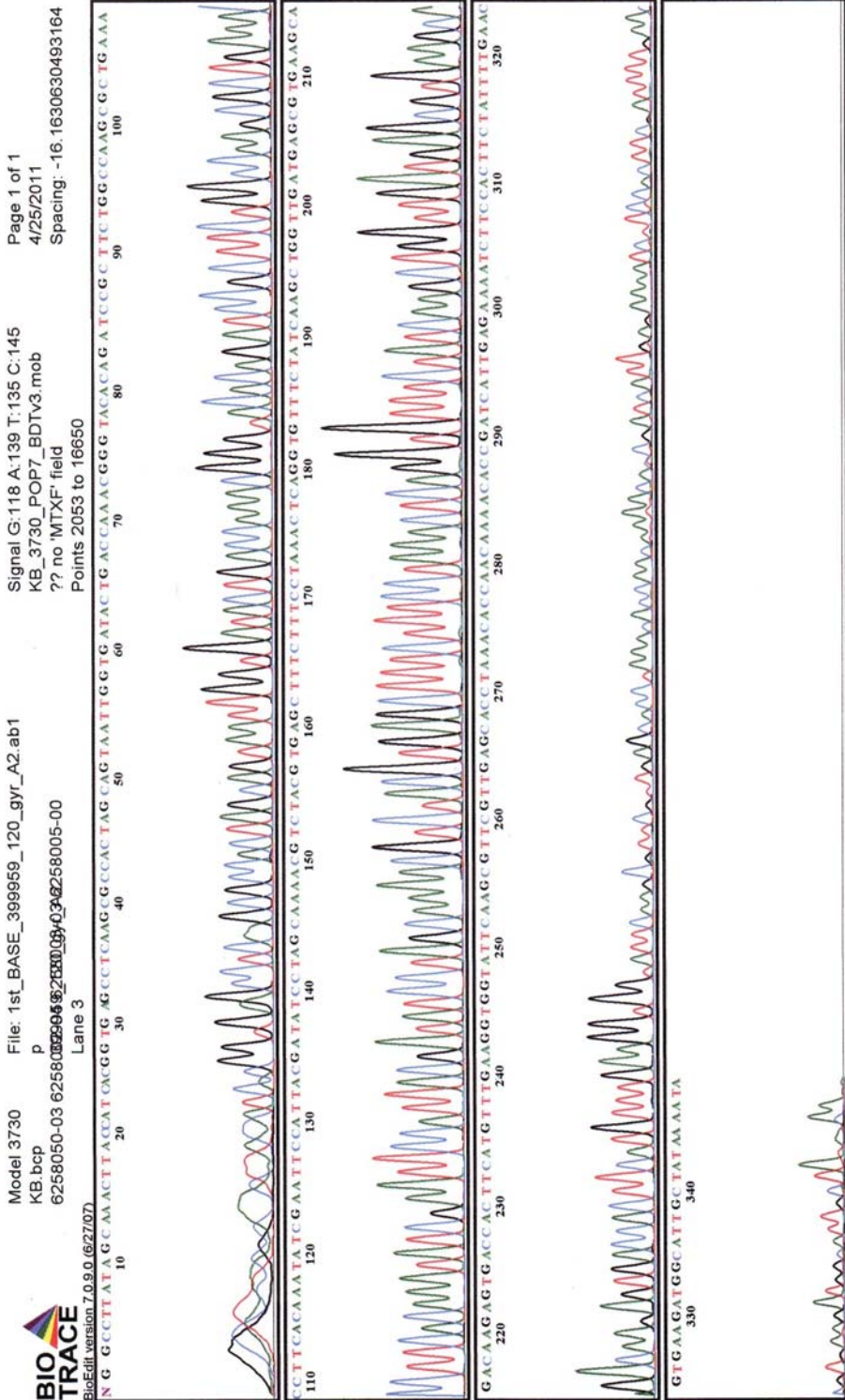
NGGCCTTATAGCAAACCTTACCATCACGGTGAGCCTCAAGCGCCACTAGCAGTAATTGGT
 GATACTGACCAAACGGGTACACAGATCCGCTTCTGGCCAAGCGCTGAAACCTTCACAA
 ATATCGAATTCCATTACGATATCCTAGCAAACGTCTACGTGAGCTTTCTTTCTAAACT
 CAGGTGTTTCTATCAAGCTGGTTGATGAGCGTGAAGCAGACAAGAGTGACCACTTCATG
 TTTGAAGTGGTATTCAAGCGTTCGTTGAGCACCTAAACACCAACAAAACACCGATCAT
 TGAGAAAATCTTCCACTTCTATTTTGAACGTGAAGATGGCATTGCTATAAAATA

Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [E](#) GEO [G](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map Viewer [P](#) PubChem BioAssay
 Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AY988161.1	Vibrio sp. PIZ 9806 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	606	606	95%	3.00E-170	99%	
AB609127.1	Vibrio owensii <i>gyrB</i> gene for DNA gyrase B subunit, partial cds	601	601	95%	1.00E-168	99%	
GU078683.1	Vibrio communis strain R-40504 DNA gyrase B subunit (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	601	601	95%	1.00E-168	99%	
FM202605.1	Vibrio campbellii partial <i>gyrB</i> gene for gyrase B subunit, strain R1311	601	601	95%	1.00E-168	99%	
FM202604.1	Vibrio campbellii partial <i>gyrB</i> gene for gyrase B subunit, strain R1117	601	601	95%	1.00E-168	99%	
FM202597.1	Vibrio campbellii partial <i>gyrB</i> gene for gyrase B subunit, culture collection CAIM 392	601	601	95%	1.00E-168	99%	
EU672845.1	Vibrio harveyi strain ATCC 33842 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	601	601	95%	1.00E-168	99%	
EF596586.1	CAIM1283 DNA gyrase B subunit (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	601	601	95%	1.00E-168	99%	
EF596585.1	Vibrio campbellii strain CAIM1500 DNA gyrase B subunit (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	601	601	95%	1.00E-168	99%	
EF596583.1	Vibrio campbellii strain CAIM392 DNA gyrase B subunit (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	601	601	95%	1.00E-168	99%	
EF596576.1	Vibrio campbellii strain CAIM3 DNA gyrase B subunit (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	601	601	95%	1.00E-168	99%	
DQ345719.1	Vibrio harveyi strain Thai DNA gyrase subunit b (<i>gyrB</i>) gene, partial cds	601	601	95%	1.00E-168	99%	

Gambar 3. Hasil sekuensing dan *alignment* gen *gyrase*

Figure 3. *Gyrase* gene sequencing and alignment result



Gambar 4. Elektroforegram hasil sekuensing untuk gen *gyrase*
Figure 4. Electroforegram of *gyrase gene sequencing result*

Desain Primer Spesifik

Desain primer spesifik dilakukan dengan bantuan perangkat lunak Primer3Plus dengan menggunakan hasil sekuen gen spesifik *haemolysin* dan *gyrase* (Gambar 5). Pensejajaran secara manual dilakukan untuk membandingkan sekuen gen dari bakteri hasil koleksi dengan sekuen gen sejenis yang terdeposit pada NCBI (Gambar 6). Pada dasarnya sembarang daerah tertentu pada sekuen referensi dapat diambil untuk dijadikan primer, tanpa perlu bantuan *software* khusus. Namun cara ini amat berisiko karena kita tidak mengetahui bagaimana kualitas primer yang dihasilkan nantinya.

Hasil desain diperoleh tiga pasang primer untuk deteksi gen *haemolysin* dan dua pasang primer untuk gen *gyrase* (Tabel 3). Pada setiap hasil desain primer yang dikeluarkan oleh perangkat lunak Primer3 selalu terdapat pasangan primer *forward* dan *reverse* yang direkomendasikan serta pilihan pasangan primer lain sebagai cadangan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini bagian dari riset Manajemen Kesehatan Ikan dan Lingkungan Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Payau dan dibiayai oleh APBN Kementerian Kelautan dan Perikanan tahun anggaran 2010-2011.

Primer3Plus
pick primers from a DNA sequence

Primer3Manager Help
About Source Code

Task: Detection Select primer pairs to detect the given template sequence. Optionally targets and included/excluded regions can be specified. **Pick Primers** Reset Form
Klik Tombol ini setelah siap

Main General Settings Advanced Settings Internal Oligo Penalty Weights Sequence Quality

Sequence Id: Option Tambah

Paste source sequence below Or upload sequence file: Choose File no file selected Upload File
Atau bisa juga upload file di sini

```
>gi|12744725|gb|AF318218.1| Tobacco mosaic virus isolate Potato4 coat protein mRNA, complete cds
ATGCTTACAGTATCACTACTCCATCTCAGTTCGAGCTCTTGTTCATCAGCGTGGGCGACCCAAATAGAGT
TAATTAATTTATGTAATAATGCTTAGGAAATCAGTTTCAAACACAACAAGCTCGAACTGTCGTTCAAAG
ACAATTCAGTGAGGTGTGGAAACCTTACCACCAAGTAACTGTTAGGTTCCCTGACAGTGACTTTAAGGTG
TACAGGTACAATGCGGTATTAGACCCGCTAGTCACAGCACTGTTAGGTGCATTGACACTAGAAATAGAA
TAATAGAGGTTGAAAATCAGCGCAACCCACGACTGCCGAAACGTTAGATGCTACTCGTAGAGTAGACGA
CGCAACGGTGGCCATAAGGAGCGGATAAATAATTAATAGTAGAATTGATCAGAGGAACCGGATCTTAT
AATCGGAGCTCTTTTCGAGAGCTCTCTCGGTTTGGTTTGGACTCTGCTCCTGCAACTGA
```

Masukkan Sekuen dalam Format RAW atau FASTA di sini

Mark selected region: <> {} {} Clear Save Sequence

Excluded Regions: < > Mengatur Daerah Penempelan Primer

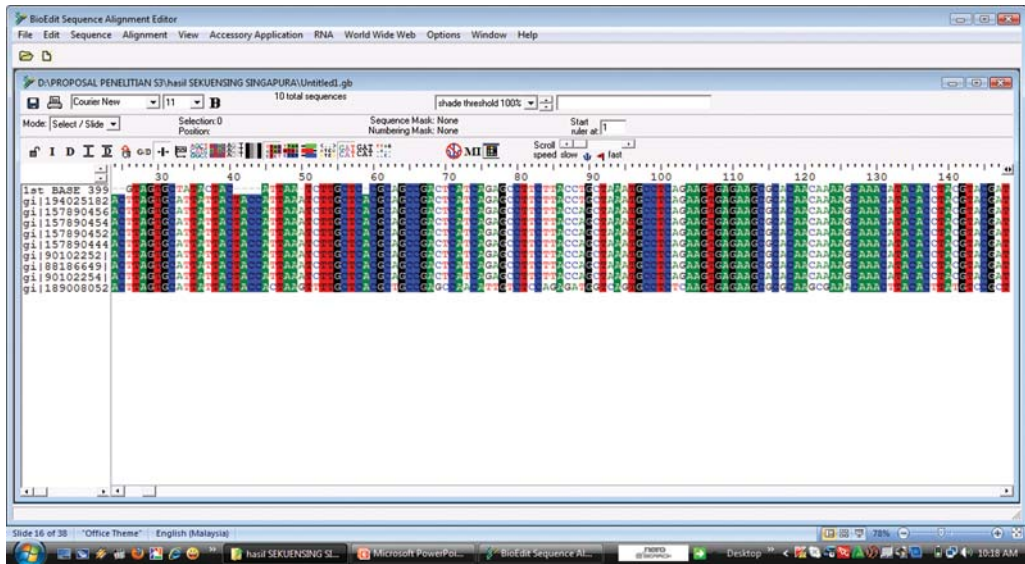
Targets: []

Included Region: { } Primer mana yang akan Anda desain? Atau Anda punya kandidat primer sendiri? Aturlah di sini

Pick left primer or use left primer below. Pick hybridization probe (internal oligo) or use oligo below. Pick right primer or use right primer below (5'->3' on opposite strand).

Gambar 5. Proses desain primer menggunakan perangkat lunak Primer3Plus

Figure 5. Primer design process using software Primer3Plus



Gambar 6. Proses pensejajaran hasil sekuen secara manual menggunakan perangkat lunak Bioedit
 Figure 6. The process sequence alignment results manually using software Bioedit

Tabel 3. Hasil desain primer spesifik
 Table 3. The result of specific primer design

DAFTAR ACUAN

Austin, B. & Zhang, X.-H. 2006. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Lett. Appl. Microbiol.*, 43: 119-124.

Baticados, M.C.L., Lavilla-Pitogo, C.R., Cruz-Lacierda, E.R., de la Pena, L.D., & Sunaz, N.A. 1990. Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi*

and *V. splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. *Diseases of Aquatic Organism.*, 9: 133-139.

Bej, A.K., Patterson, D.P., Brasher, C.W., Vickery, M.C., Jones, D.D., & Kaysner, C.A. 1999. Detection of total and *haemolysin*-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. *J. Microbiol. Methods*, 36: 215-225.

- Ben-Haim, Y., Thompson, F. L., Thompson, C. C., Cnockaert, M.C., Hoste, B., Swings, J., & Rosenberg, E. 2003. *Vibrio coralliilyticus* sp. nov., a temperature-dependent pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53: 309-315.
- Benson, H.J. 1985. Microbiological Applications: A Laboratory Manual in General Microbiology. Fourth Edition. Wm. C. Brown Publishers. Dubuque, Iowa, 450 pp.
- Cano-Gomez, A., Bourne, D.G., Hall, M.R., Owens, L. & Hoj, L. 2009. Molecular identification, typing and tracking of *Vibrio harveyi* in aquaculture systems: Current methods and future prospects. *Aquaculture*, 287: 1-10.
- Conejero, M.J.U. & Hedreyda, C.T. 2004. PCR detection of *haemolysin* (vhh) gene in *Vibrio harveyi*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 50: 137-142.
- Cunningham, C.O. 2002. Molecular diagnosis of fish and shellfish diseases: present status and potential use in disease control. *Aquaculture*, 206: 19-55.
- Defoirdt, T. 2007. *Quorum sensing disruption and the use of short-chain fatty acids and polyhydroxyalkanoates to control luminescent Vibriosis*. PhD thesis, Ghent University, Belgium, 228 pp.
- Karunasagar, I., Pai, R., Malathi, G.R., & Karunasagar, I. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*, 128: 203-209.
- Moriarty, D.J.W. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture*, 168: 351-358.
- Nishibuchi, M., Khaeomane-iam, V., Honda, T., Kaper, J.B., & Miwatani, T. 1990. Comparative analysis of the *haemolysin* genes of *Vibrio cholerae* non-O1, *Vibrio mimicus*, and *Vibrio hollisae* that are similar to the *tdh* gene of *Vibrio parahaemolyticus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 67: 251-256.
- Nishibuchi, M. & Kaper, J. 1995. Thermostable direct *haemolysin* gene of *Vibrio parahaemolyticus*: A virulence gene acquired by a marine bacterium. *Infect. Immun.*, 63: 2,093-2,099.
- Pang, L., Zhang, X.H., Zhong, Y., Chen, J., Li, Y., & Austin, B. 2006. Identification of *Vibrio harveyi* using PCR amplification of the *toxR* gene. *Let. Appl. Microbiol.*, 43: 249-255.
- Parentrengi, A. 2000. *Studies on genetic variability of groupers (Genus: Epinephelus) from Indo-Malaysian waters using PCR-RAPD Analysis*. Thesis master of Science, Kolej University Terengganu, Universiti Putra Malaysia, 174 pp.
- Saulnier, D., Haffner, P., Goarant, C., Levy, P., & Ansquer, D. 2000. Experimental infection models for shrimp *Vibriosis* studies: a review. *Aquaculture*, 191: 133-144.
- Thaithongnum, S., Ratanama, R., Weeradechapol, K., Sukhoom, A., & Vuddhakul, V. 2006. Detection of *Vibrio harveyi* in shrimp post-larvae and hatchery tank water by the most probable number technique with PCR. *Aquaculture*, 261: 1-9.
- Zhang, X.H. & Austin, B. 2000. Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids. *J. Fish Dis.*, 23: 93-102.
- Zhang, X.H., Meaden, P.G., & Austin, B. 2001. Duplication of *haemolysin* genes in a virulent isolate of *Vibrio harveyi*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 3,161-3,167.