

**PENGEMBANGAN PENANDA *MULTIPLEX* PCR UNTUK
IDENTIFIKASI BAKTERI *Aeromonas hydrophila***

SKRIPSI

Diajukan untuk memenuhi syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

Program Studi Biologi



Oleh:

Ricky Awaludin Cahyadi

NIM.1803797

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
DEPARTEMEN PENDIDIKAN BIOLOGI
FAKULTAS PENDIDIKAN MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS PENDIDIKAN INDONESIA**

2022

**PENGEMBANGAN PENANDA *MULTIPLEX* PCR UNTUK
IDENTIFIKASI BAKTERI *Aeromonas hydrophila***

Oleh

Ricky Awaludin Cahyadi

Sebuah skripsi yang diajukan untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana pada Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

© Ricky Awaludin Cahyadi 2022

Universitas Pendidikan Indonesia
2022

Hak Cipta dilindungi undang-undang

Skripsi ini tidak boleh diperbanyak seluruhnya atau sebagian, dengan dicetak ulang, difoto kopi, atau cara lainnya tanpa izin dari penulis

LEMBAR PENGESAHAN
PENGEMBANGAN PENANDA *MULTIPLEX* PCR UNTUK
IDENTIFIKASI BAKTERI *Aeromonas hydrophila*

Oleh:

Ricky Awaludin Cahyadi

DISETUJUI DAN DISAHKAN OLEH:

Pembimbing I,

Dr. Hj. Diah Kusumawaty, M.Si

NIP. 197008112001122001

Pembimbing II,

Dr. Any Aryani, M.Si.

NIP. 197105302001122001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Biologi,

Dr. Hj. Diah Kusumawaty, M.Si

NIP. 197008112001122001

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi dengan judul “**Pengembangan Penanda *Multiplex* PCR untuk Identifikasi Bakteri *Aeromonas hydrophila***” ini beserta seluruh isinya adalah benar-benar karya saya sendiri. Saya tidak melakukan penjiplakan atau pengutipan dengan cara-cara yang tidak sesuai dengan etika ilmu yang berlaku dalam masyarakat keilmuan. Atas pernyataan ini saya siap menanggung resiko.sanksi apabila di kemudian hari ditemukan adanya pelanggaran etika keilmuan ataupun klaim terhadap keaslian karya saya ini.

Bandung, Agustus 2022

Ricky Awaludin Cahyadi

NIM. 1803797

UCAPAN TERIMA KASIH

Segala puji bagi Allah SWT yang telah memberikan nikmat dan kemudahan kepada penulis sebagai hamba-Nya, atas karunia dan kehendak-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “Pengembangan Penanda *Multiplex* untuk Identifikasi Bakteri *Aeromonas hydrophila*”. Shalawat dan salam selalu tercurah limpahkan kepada Nabi Muhammad SAW, kepada keluarganya, sahabatnya, hingga umat-umatnya sampai akhir zaman dan semoga kita semua mendapatkan syafaatnya di akhirat kelak.

Dengan selesainya penyusunan skripsi ini, penulis mengucapkan terimakasih kepada seluruh pihak yang telah membantu, memotivasi, dan mendoakan penulis selama ini, khususnya kedua orangtua atas kasih sayang, bimbingan, nasihat, dan segalanya sejak awal perkuliahan hingga akhir penyusunan skripsi ini. Penyusunan skripsi ini tidak luput dari bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dengan ini penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. Ibu Dr. Hj. Diah Kusumawaty, M.Si., selaku Dosen Pembimbing I, Dosen Pembimbing Akademik, dan Ketua Program Studi Biologi atas segala bantuan, bimbingan, nasihat, do'a, dan ilmu yang telah diberikan kepada penulis selama masa perkuliahan hingga akhir dari penyusunan skripsi dan berhasil menyelesaikan skripsi ini.
2. Ibu Dr. Any Aryani, M.Si., selaku Dosen Pembimbing II atas segala bantuan, bimbingan, nasihat, do'a, dan ilmu yang telah diberikan kepada penulis selama masa perkuliahan hingga akhir dari penyusunan skripsi dan berhasil menyelesaikan skripsi ini.
3. Bapak Dr. Bambang Supriatno, M.Si, selaku Ketua Departemen Pendidikan Biologi FPMIPA UPI atas segala bantuan, ilmu, serta motivasi yang diberikan selama masa perkuliahan.
4. Seluruh dosen Departemen Pendidikan Biologi FPMIPA UPI yang senantiasa memberikan ilmu dan bimbingannya selama menjadi mahasiswa di Biologi UPI.
5. Seluruh Staff Tata Usaha Departemen Pendidikan Biologi dan laboran FPMIPA UPI yang telah banyak memberikan bantuan dan menyelesaikan

administrasi penulis selama menjadi mahasiswa.

6. Keluarga tercinta yang senantiasa memberikan do'a, semangat, kasih sayang baik secara moril maupun material untuk penulis selama menjadi mahasiswa sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini tepat waktu.
7. Teman-teman Republik Tarampo beserta seluruh kabinetnya yang selalu membantu, mendukung satu sama lain dalam menyelesaikan masalah, memberikan semangat, bercanda dan tertawa selama masa perkuliahan ini.
8. Teman-teman Biologi C 2018 dan Taraksa Danadyaksa yang saling memberikan bantuan dan dukungan selama perkuliahan.
9. Seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan satu-persatu, terima kasih sudah membantu, mendukung, memberi semangat, dan do'a sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik.

Semoga Allah SWT. Senantiasa memberikan kebaikan dan kemudahan yang melimpah sebagai balasan atas kebaikannya yang telah diberikan. Semoga skripsi ini juga dapat memberikan manfaat bagi pihak yang membaca dan membutuhkan. Aamiin.

Bandung, Agustus 2022

Ricky Awaludin Cahyadi

PENGEMBANGAN PENANDA *MULTIPLEX* PCR UNTUK IDENTIFIKASI BAKTERI *Aeromonas hydrophila*

ABSTRAK

Dalam suatu kegiatan budidaya ikan, banyak permasalahan yang dihadapi oleh para pembudidaya ikan salah satunya adalah permasalahan penyakit. Salah satu penyakit yang disebabkan oleh bakteri pada ikan adalah penyakit *Motile Aeromonas Septicemia* (MAS). MAS merupakan penyakit serius yang menyerang semua jenis ikan air tawar di daerah tropis yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila*. Penyakit ini tidak hanya menginfeksi ikan, namun juga patogen terhadap udang dan amfibi. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengembangkan primer *multiplex* untuk pendeteksian *Aeromonas hydrophila* patogen. Terdapat empat sampel bakteri *Aeromonas hydrophila* dan satu sampel bakteri *Aeromonas taiwanensis* yang digunakan dalam pengujian ini. Sebelumnya dilakukan perancangan primer secara *in silico*. Sampel di uji secara molekuler sebagai validasi secara molekuler menggunakan PCR dengan 16S rDNA dan lima gen virulen *Aeromonas hydrophila* (*AerA*, *alt*, *ahpA*, *HlyA*, dan *ast*). Selanjutnya dilakukan uji secara *in vitro* yaitu pengujian *Single* dan *Multiplex* PCR. Hasil amplifikasi seluruh sampel dengan 16S rDNA menghasilkan amplicon 1.500 bp yang menunjukkan bahwa sampel yang diuji merupakan mikro organisme. Lima gen virulen primer *multiplex* dibuat dalam satu set (*AerA*, *alt*, *ahpA*, *HlyA*, dan *ast*). Primer dilakukan optimasi secara *single* PCR dengan rentang Ta 55-65°C dengan Ta yang optimal yaitu 58°C Berdasarkan uji *multiplex* PCR semua gen yang dirancang berhasil di amplifikasi namun belum ada sampel yang memunculkan ke lima gen yang diuji sehingga penelitian dengan sekuensing pun dibutuhkan sebagai validasi dari sampel yang diuji.

Kata Kunci: *Aeromonas hydrophila*, *Motile Aeromonas Septicemia* (MAS), *Multiplex* PCR, *in vitro*, *in silico*

DEVELOPMENT OF MULTIPLEX PCR MARKERS FOR IDENTIFICATION OF *Aeromonas hydrophila* BACTERIA

ABSTRACT

In a fish farming activity, many problems faced by fish cultivators, one of which is the problem of disease. One of the diseases caused by bacteria is Motile Aeromonas Septicemia (MAS). MAS is a serious disease that attacks all types of freshwater fish in the tropics caused by the bacterium Aeromonas hydrophila. This disease not only infects fish, but is also pathogenic to shrimp and amphibians. The purpose of this research is to develop multiplex primers for the detection of Aeromonas hydrophila pathogen. There were four bacteria strain of Aeromonas hydrophila and one Aeromonas taiwanensis sample were used in this research. Previously, the primary design was carried out in silico. The samples were tested molecularly for molecular validation using PCR with 16S rDNA and five virulent Aeromonas hydrophila genes (AerA, alt, ahpA, HlyA, and ast). Furthermore, in vitro tests were carried out. Single and Multiplex PCR Testing. The results of the amplification of all samples with 16S rDNA resulted in a 1,500 bp amplicon indicating that the sample tested was a micro-organism. Five multiplex primary virulent genes were created in one set (AerA, alt, ahpA, HlyA, and ast). The primers were optimized by single PCR with a range of Ta 55°-65°C. Optimal Ta results were obtained at 58°C, which was then followed by multiplex PCR testing with optimal Ta. Based on the multiplex PCR test, all of the designed genes were successfully amplified, but there were no samples that gave rise to the five tested genes, so sequencing studies were needed as validation of the tested samples.

Keywords: Aeromonas hydrophila, Motile Aeromonas Septicemia (MAS), Multiplex PCR, in vitro, in silico

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN	i
PERNYATAAN.....	ii
UCAPAN TERIMA KASIH.....	iii
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
BAB I PENDAHULUAN	2
1.1. Latar Belakang	2
1.2. Rumusan Masalah.....	3
1.3. Pertanyaan Penelitian.....	3
1.4. Batasan Masalah	4
1.5. Tujuan Penelitian	4
1.6. Manfaat Penelitian	4
1.7. Struktur Organisasi	4
BAB II KAJIAN PUSTAKA	7
2.1. <i>Aeromonas hydrophila</i>	7
2.1.1. Klasifikasi dan morfologi <i>Aeromonas hydrophila</i>	7
2.1.2. Habitat dan penyebaran <i>Aeromonas hydrophila</i>	7
2.1.3. Patogenitas <i>Aeromonas hydrophila</i>	7
2.2. Faktor virulensi <i>Aeromonas</i>	7
2.2.1 Faktor virulensi dari komponen struktural.	7
2.2.2. Faktor virulensi dari enzim ekstraseluler.....	8
2.3. Polymerase Chain Reaction (PCR).....	10
2.4. <i>Multiplex</i> PCR.....	12
2.4.1. Perancangan Primer <i>Multiplex</i> PCR.....	13
2.5. Penanda Genetik	15
2.6. Elektroforesis	16
2.7. Analisis Kuantitatif dan Kualitatif DNA	18
2.7.1. Analisis Kuantitatif DNA	18
2.7.2. Analisis Kualitatif DNA.....	20

BAB III METODE PENELITIAN	20
3.1. Jenis Penelitian.....	20
3.2. Waktu dan Lokasi Penelitian	20
3.3. Alat dan Bahan.....	20
3.3.1. Alat penelitian.....	20
3.3.2. Bahan Penelitian.....	22
3.4. Prosedur Penelitian	23
3.4.1. Tahap persiapan.....	23
3.4.2. Tahap penelitian	26
3.5. Alur Penelitian	30
BAB IV TEMUAN DAN PEMBAHASAN	31
4. Temuan dan Pembahasan.....	31
4.1 Perancangan Primer dan Hasil Pengujian Primer secara <i>in silico</i>	31
4.1.1 Perancangan Primer.....	31
4.1.2. Analisa Struktur Sekunder dan Uji Homologi Primer.....	32
4.1.3. Pengujian Primer <i>Multiplex</i> secara <i>in silico</i>	37
4.2. Hasil Ekstraksi DNA.....	39
4.2.1. Uji Kuantitatif DNA.....	39
4.2.2. Uji Kualitatif DNA	40
4.2.3. Hasil Uji Kualitatif Primer Universal 16S rDNA.....	40
4.3. Hasil Optimasi Uji Amplifikasi <i>Single</i> PCR.....	44
4.4. Hasil Uji Amplifikasi dengan <i>Multiplex</i> PCR	47
4.5. Hasil Pengujian dan Perbandingan <i>Single</i> dan <i>Multiplex</i> PCR.....	51
4.6. Analisis Hasil <i>Single</i> dan <i>Multiplex</i> PCR	52
4.6.1. Analisis Hasil <i>Single</i> PCR.....	52
4.6.2. Analisis Hasil <i>Multiplex</i> PCR.....	53
BAB V SIMPULAN, IMPLIKASI, REKOMENDASI, DAN HAMBATAN PENELITIAN.....	55
5.1. Simpulan	55
5.2. Implikasi	55
5.3. Rekomendasi.....	55
5.4. Hambatan Penelitian	56
DAFTAR PUSTAKA	58
LAMPIRAN.....	62

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1. Alat yang Digunakan	20
Tabel 3.2. Bahan yang Digunakan	22
Tabel 3.3. Data Gen yang Digunakan untuk Merancang dan Mendesain Primer.	26
Tabel 4.1. Data Akses dan Ukuran Sekuen Gen Pilihan.....	32
Tabel 4.2. Desain Primer Gen Virulen <i>Aeromonas hydrophila</i>	33
Tabel 4.3. Hasil Analisa Struktur Sekunder.....	33
Tabel 4.4. Hasil Uji Homologi BLAST Gen Virulen <i>AerA</i>	34
Tabel 4.5. Hasil Uji Homologi BLAST Gen Virulen <i>alt</i>	35
Tabel 4.6. Hasil Uji Homologi BLAST Gen Virulen <i>ahpA</i>	35
Tabel 4.7. Hasil Uji Homologi BLAST Gen Virulen <i>HlyA</i>	36
Tabel 4.8. Hasil Uji Homologi BLAST Gen Virulen <i>ast</i>	36
Tabel 4.9. Hasil Uji Kuantitatif DNA	39
Tabel 4.10. Primer Pengujian 16S rDNA.....	41
Tabel 4.11. Perhitungan PCR <i>Mix</i> untuk Optimasi <i>Single</i> PCR	44
Tabel 4.12. Perhitungan <i>Mix</i> PCR <i>Multiplex</i>	48
Tabel 4.13. Pengujian <i>Single</i> PCR	53
Tabel 4.14. Hasil <i>Multiplex</i> PCR	54
Tabel 4.15. Perbandingan Primer Gen Virulen Pustaka dengan Hasil Pengujian <i>Multiplex</i> PCR.....	54

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. <i>Aeromonas hydrophila</i>	7
Gambar 2.2. Perbandingan Tradisional PCR dengan <i>Multiplex</i> PCR.....	13
Gambar 2.3. DNA Marker yang Digunakan dalam Penelitian	17
Gambar 3.1. Sekuen Primer yang Disimpan.....	25
Gambar 3.2. Bagan Alur Penelitian	30
Gambar 4.1. Nilai ΔG Tiap Primer.....	37
Gambar 4.2. Hasil Pengujian Thresholding ΔG Pada Primer	37
Gambar 4.3. Dendogram File Genom.....	38
Gambar 4.4. Hasil Amplifikasi Primer dengan Data <i>Genome Assembly Aeromonas hydrophila</i> NCBI	38
Gambar 4.5. Hasil elektroforesis DNA sampel,.....	40
Gambar 4.6. Hasil Uji 16S rDNA Pertama.....	42
Gambar 4.7. Hasil Uji dengan Primer Universal 16S DNA	43
Gambar 4.8. Hasil Pengujian Primer Universal 16S DNA.	43
Gambar 4.9. Optimasi <i>Single</i> PCR dengan Primer Baru <i>Annealing</i> 60°C.....	45
Gambar 4.10. Hasil Optimasi <i>Single</i> PCR Primer Lama <i>Annealing</i> 60°C	45
Gambar 4.11. Hasil Optimasi Primer Gen AerA <i>Annealing</i> 64°C.....	46
Gambar 4.12. Hasil Optimasi Pengujian <i>Single</i> PCR suhu <i>Annealing</i> 56°C.....	46
Gambar 4.13. Hasil Optimasi Pengujian Gen AerA suhu <i>Annealing</i> 55°C.....	47
Gambar 4.14. Optimasi <i>Annealing</i> 55°C Full Primer	47
Gambar 4.15. Hasil <i>Multiplex</i> PCR <i>Annealing</i> 58°C.....	49
Gambar 4.16. Hasil PCR <i>Multiplex</i> <i>Annealing</i> 60°C.....	49
Gambar 4.17. Hasil <i>Multiplex</i> PCR Gen <i>A. hydrophila</i> <i>Annealing</i> 55°C	50
Gambar 4. 18. Hasil <i>Multiplex</i> PCR Gen <i>Annealing</i> 58°C	50
Gambar 4.19. Hasil 60°C <i>Annealing</i> Dengan Ukuran	51
Gambar 4.20. <i>Aeromonas hydrophila</i> ITB dan <i>Aeromonas hydrophila</i> InaCC <i>Single</i> dan <i>Multiplex</i> PCR	51
Gambar 4.21. <i>Aeromonas hydrophila</i> IBN dan <i>Aeromonas hydrophila</i> M3 <i>Single</i> dan <i>Multiplex</i> PCR	52
Gambar 4. 22. <i>Aeromonas taiwanensis</i> InaCC <i>Single</i> dan <i>Multiplex</i> PCR.....	52

DAFTAR PUSTAKA

- Austin, B., Austin, D.A.J., & Building, J. M. (2007). *Bacterial Fish Pathogens Diseases of Farmed and Wild Fish Fourth Edition*.
- Beaz-Hidalgo, R., & Figueras, M. J. (2013). *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. *Journal of Fish Diseases*, 36(4), 371–388. <https://doi.org/10.1111/jfd.12025>
- Bier, M. (1967). *Electrophoresis: Vol. II*. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(55\)02161-7](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(55)02161-7)
- Brown, S. S., Chen, Y. W., Wang, M., Clipson, A., Ochoa, E., & Du, M. Q. (2017). PrimerPooler: Automated primer pooling to prepare library for targeted sequencing. *Biology Methods and Protocols*, 2(1). <https://doi.org/10.1093/BIOMETHODS/BPX006>
- Camus A. C., Durborow R. M., Hemstreet W. G., Thune R. L., & Hawke J. P. (1998). *Aeromonas* bacterial infections - motile *Aeromonas* septicemia. *Southern Regional Aquaculture Center*, 478(478).
- Cascón, A., Fregeneda, J., Aller, M., Yugueros, J., Temprano, A., Hernanz, C., Sánchez, M., Rodríguez-Aparicio, L., & Naharro, G. (2000). Cloning, characterization, and insertional inactivation of a major extracellular serine protease gene with elastolytic activity from *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Fish Diseases*, 23(1), 49–59. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2000.00206.x>
- Cheng, S., Fockler, C., Barnes, W. M., & Higuchi, R. (1994). Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(12), 5695–5699. <https://doi.org/10.1073/PNAS.91.12.5695>
- Clarridge, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 840–862. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.840-862.2004>
- Dorsch, M., Ashbolt, N. J., Cox, P. T., & Goodman, A. E. (1994). Rapid identification of *Aeromonas* species using 16S rDNA targeted oligonucleotide primers: a molecular approach based on screening of environmental isolates. *Journal of Applied Bacteriology*, 77(6), 722–726. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb02825.x>
- Du, X., Wang, M., Zhou, H., Li, Z., Xu, J., Li, Z., Kan, B., Chen, D., Wang, X., Jin, Y., Ren, Y., Ma, Y., Liu, J., Luan, Y., Cui, Z., & Lu, X. (2021). Comparison of the Multiple Platforms to Identify Various *Aeromonas* Species. *Frontiers in Microbiology*, 0, 3528. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.625961>

- Fernández-Bravo & Figueras, M. J. (2020). An Update on the Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Epidemiology, and Pathogenicity. *Microorganisms* 2020, Vol. 8, Page 129, 8(1), 129. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8010129>
- Haryani, A., Grandiosa, R., Buwono, I. D., & Santika, A. (2012). Uji Efektivitas Daun Pepaya (*Carica papaya*) Untuk Pengobatan Infeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila* Pada Ikan Mas Koki (*Carassius auratus*). *Jurnal Perikanan Kelautan*, 3(3). <http://jurnal.unpad.ac.id/jpk/article/view/1453>
- Hazen, T. C., Fliermans, C. B., Hirsch, R. P., & Esch, G. W. (1978). Prevalence and Distribution. *Microbiology*, 36(5), 731–738.
- Healy, E. F. (2007). Quantitative determination of DNA-ligand binding using fluorescence spectroscopy. An undergraduate biochemistry experiment. *Journal of Chemical Education*, 84(8), 1304–1307. <https://doi.org/10.1021/ed084p1304>
- Henegariu, O., Heerema, N. A., Dlouhy, S. R., Vance, G. H., & Vogt, P. H. (1997). Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. *BioTechniques*, 23(3), 504–511. <https://doi.org/10.2144/97233rr01>
- Hernandez-Rodriguez, P., & Gomez, A. P. R. (2012). *Polymerase Chain Reaction*. <https://doi.org/10.5772/2204>
- Heuzenroeder, M. W., Wong, C. Y. & Flower, R. L. (1999). Distribution of two hemolytic toxin genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp.: correlation with virulence in a suckling mouse model. *FEMS Microbiology Letters*, 174(1), 131–136. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.1999.TB13559.X>
- Hussain, I., Hussain, I. A., Jeyasekaran, G., Shakila, R. J., Raj, K. T., & Jeevithan, E. (2013). Prevalence of Hemolytic and Enterotoxigenic *Aeromonas* Spp. in Healthy and Diseased Freshwater Food Fishes as Assessed by Multiplex PCR National Surveillance Programme for Aquatic Animal Diseases View project Development of Market Driven Value Added Fish P. *Columbia International Publishing American Journal of Advanced Food Science and Technology*, 1, 70–85. <https://doi.org/10.7726/ajafst.2013.1007>
- Illanchezian, S., Jayaraman, S., Manoharan, M. S., & Valsalam, S. (2010). Virulence and cytotoxicity of seafood borne *Aeromonas hydrophila*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(4), 978. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220100004000016>
- Indriati, M. & Yuniarsih, E. (2019). Multiplex PCR Method of Detecting Pork to Guarantee Halal Status in Meat Processed Products. *Jurnal Ilmu Produksi Dan Teknologi Hasil Peternakan*, 7(3), 96–101. <https://doi.org/10.29244/jipthp.7.3.96-101>
- Institute, N. H. G. R. (2022). *Genetic Marker*. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Genetic-Marker>
- Jiang, H., Dong, H., Zhang, G., Yu, B., Chapman, L. R., & Fields, M. W. (2006). Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athalassohaline

- lake in northwestern China. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), 3832–3845. <https://doi.org/10.1128/AEM.02869-05>
- Johansson, B. G. (1972). Agarose gel electrophoresis. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 29(S124), 7–19. <https://doi.org/10.3109/00365517209102747>
- Kaufmann, M. E. (2006). Pulsed-field gel electrophoresis. In *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology* (Vol. 15, pp. 143–157). https://doi.org/10.1007/0-387-32892-0_9
- Kim, H., Kang, N. N., An, K. H., Koo, J. H., & Kim, M. S. (2016). MRPrimerW: a tool for rapid design of valid high-quality primers for multiple target qPCR experiments. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W259–W266. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKW380>
- Kusumawaty, D., Pancoro, A., Nyoman, I., Aryantha, P., & Suhandono, S. (2016). Evaluation of identification techniques for the fish pathogen, *Aeromonas hydrophila*, from Indonesia. *Malaysian Journal of Microbiology*, 12(3), 191–198. <https://doi.org/10.21161/mjm.77915>
- Li, J., Ni, X. D., Liu, Y. J., & Lu, C. P. (2011). Detection of three virulence genes *alt*, *ahp* and *aerA* in *Aeromonas hydrophila* and their relationship with actual virulence to zebrafish. *Journal of Applied Microbiology*, 110(3), 823–830. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.2011.04944.X>
- Lucena-aguilar, G., Mari, A., Barbera, C., Carrillo-a, A., & Lo, A. (2016). *DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis*. 14(4), 264–270. <https://doi.org/10.1089/bio.2015.0064>
- Markoulatos, P., Siafakas, N., & Moncany, M. (2002). Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 16(1), 47–51. <https://doi.org/10.1002/JCLA.2058>
- Martinez, M. J., Simon-Pujol, D., Congregado, F., Merino, S., Rubires, X., & Tomis, J. M. (1995). The presence of capsular polysaccharide in mesophilic *Aeromonas hydrophila* serotypes 0:11 and 0:34. *FEMS Microbiology Letters*, 128, 69–74. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07502.x>
- NCI. (2022). *Definition of genetic marker - NCI Dictionary of Genetics Terms - NCI*. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/genetics-dictionary/def/genetic-marker>
- Pemberton, J. M., Kidd, S. P., & Schmidt, R. (1997). Secreted enzymes of *aeromonas*. *FEMS Microbiology Letters*, 152(1), 1–10. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(97\)00186-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(97)00186-9)
- PrimerBioSoft. (2020). *Primer Design Guide for PCR :: Learn Designing Primers for PCR*. http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html
- Promega Corporation. (2019). *Technical Manual Wizard® Genomic DNA Purification Kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit. Technical Bulletin*,

1–19. www.promega.com

- Promega Corporation. (2020). *How do I determine the concentration, yield and purity of a DNA sample?* <https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/enotes/how-do-i-determine-the-concentration-yield-and-purity-of-a-dna-sample/>
- Qureshi, S., & Qamar, F. N. (2020). Miscellaneous Bacterial Enteritides. *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases*, 512–517. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-55512-8.00051-x>
- Rasmussen-Ivey, C. R., Figueras, M. J., McGarey, D., & Liles, M. R. (2016). Virulence factors of *Aeromonas hydrophila*: In the wake of reclassification. *Frontiers in Microbiology*, 7(AUG), 1337. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.01337/BIBTEX>
- Reith, M. E., Singh, R. K., Curtis, B., Boyd, J. M., Bouevitch, A., Kimball, J., Munholland, J., Murphy, C., Sarty, D., Williams, J., Nash, J. H. E., Johnson, S. C., & Brown, L. L. (2008). The genome of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449: Insights into the evolution of a fish pathogen. *BMC Genomics*, 9, 1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-427>
- Sint, D., Raso, L., & Traugott, M. (2012). Advances in multiplex PCR: Balancing primer efficiencies and improving detection success. *Methods in Ecology and Evolution*, 3(5), 898–905. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2012.00215.x>
- Stratev, D., Gurova, E., Vashin, I., & Daskalov, H. (2016). Agricultural Academy. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 22(2), 308–314.
- Tomás, J. M. (2012). The Main *Aeromonas* Pathogenic Factors . *ISRN Microbiology*, 2012, 1–22. <https://doi.org/10.5402/2012/256261>
- Triani, S. (2020). *Desain Dan Optimasi Primer Multipleks Untuk Deteksi Efektif Bakteri Aeromonas hydrophila Patogen*. Universitas Pendidikan Indonesia.
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., & Leunissen, J. A. M. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research*, 35(SUPPL.2), 71–74. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm306>
- Vogelstein, B., & Gillespiet, D. (1979). *Preparative and analytical purification of DNA from agarose*. 76(2), 615–619. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.2.615>
- Wadstriim, T., Ljunghs, A., & Wretlindz, B. (1976). Enterotoxin, haemolysin and cytotoxic protein in *aeromonas hydrphila* human infection. *Acta Path. Microbiol. Scand. Sect.B*, 84(18), 112–114.
- Wang, G., Clark, C. G., Liu, C., Pucknell, C., Munro, C. K., Kruk, T. M. A. C., Caldeira, R., Woodward, D. L., & Rodgers, F. G. (2003). Detection and characterization of the hemolysin genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(3), 1048–1054. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.3.1048-1054.2003>
- Wilfinger, W. W., Mackey, K., & Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity.

Ricky Awaludin Cahyadi, 2022

**PENGEMBANGAN PENANDA MULTIPLEX UNTUK IDENTIFIKASI
BAKTERI AEROMONAS HYDROPHILA**

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

BioTechniques, 22(3), 474–481. <https://doi.org/10.2144/97223st01>

- Wong, C. Y. F., Heuzenroeder, M. W., & Flower, R. L. P. (1998). Inactivation of two haemolytic toxin genes in *Aeromonas hydrophila* attenuates virulence in a suckling mouse model. *Microbiology*, 144(2), 291–298. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-2-291>
- Xiong, J., Huang, B., Guo, S. L., Xu, J. S., & Huang, W. (2019). A novel multiplex PCR assay for rapid detection of virulent *Aeromonas* in cultured eels. *Journal of Applied Microbiology*, 127(2), 418–428. <https://doi.org/10.1111/jam.14311>
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13(134).