Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi, Vol. 12, No. 1, 2007, halaman 11 - 17
Akreditasi DIKTI Depdiknas RI No. 49/DIKTI/Kep/2003

ISSN : 1410 – 0177

IDENTIFIKASI BAKTERI *Vibrio parahaemolitycus* DENGAN METODE *BIOLOG* DAN DETEKSI GEN *ToxR* NYA SECARA PCR

Marlina, Rustini, Ratna Sari Wibowo
Fakultas Farmasi Universitas Andalas

Diterima tanggal : 10 Januari 2008 disetujui : 20 Maret 2008

Abstract

Eighteen cultures of *Vibrio parahaemolitycus* had been isolated from sea water at Pasir Jambak and Bungus Beach, Padang using CHROMAgar Vibrio media. Further identification was done by using Biolog methods towards three cultures of *V.parahaemolitycus* and the results are probability 68%, 78% and 85% respectively. Identification of *V. parahaemolitycus* by using PCR methods towards fourteen cultures showed that all cultures had the amplicon at 368 bp.

Keywords : vibrio parahaemolitycus, Biolog, *ToxR*, PCR

Pendahuluan

Perairan laut merupakan tempat hidup berbagai mikroorganisme dan makroorganisme. Antara mikroaganisme dan makroorganisme akan terjadi interaksi seperti bakteri akan bersimbiosis dengan organisme yang hidup diperairan seperti plankton, zooplankton, ikan, udang, kerang, (Alcamo, 1995). Keadaan salinitas laut sangat memungkinkan bagi bakteri halofilik untuk hidup. Beberapa genus yang dapat ditemukan adalah *Vibrio, Pseudomonas, Flavobacterium* dan *Achromobacter* (Pelczar and Roger, 1965). Salah satu species Vibrio adalah terdapat di air laut adalah *Vibrio parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus dapat menyebabkan gastroenteritis dengan gejala diare, kram perut, mual, muntah, demam dengan masa inkubasi antara 4-96 jam dengan rata-rata 15 jam. Bakteri ini juga dapat menyebabkan infeksi pada luka terbuka yang berkontak dengan air laut (DePaola, 1990; Yuherman, 2001).

Identifikasi bakteri dapat dilakukan dengan mengamati hasil reaksi biokimia yang terjadi pada bakteri, salah satu metode terbaru untuk identifikasi pada tingkat reaksi biokimia adalah metode Biolog. Metoda Biolog dirancang untuk mengidentifikasi bakteri, jamur dan yeast berdasarkan reaksi biokimia yang terjadi karena perbedaan sumber karbon yang terdapat didalam 95 lubang mikroplate. Mikroplate Biolog pertama kali diperkenalkan pada tahun 1989. Sumber karbon ini berasal dari polimer, gula, gula fosfat, asam amino, alkohol, asam karboksilat (Tang, 1998)

Bakteri *V. parahaemolyticus* mempunyai gen spesifik yaitu *toxR*. Gen ini pertama kali ditemukan pada bakteri *V. cholerae* tetapi kemudian ditemukan juga pada *V. parahaemolyticus*.
Gen *toxR* akan mengaktifkan gen-gen lainnya untuk menghasilkan produksi toksin yang berupa hemolisin seperti *Thermostable Direct Hemolysin* (TDH), *Thermostable –Related Hemolysin* (TRH), mekanisme patogen *V. parahaemolyticus* ada hubungannya dengan produksi gen *tdh* dan gen *trh* ini yang memberikan respon terhadap *β- Hemolisis*. Untuk mengidentifikasi *V. parahaemolyticus* dalam waktu singkat dari sampel makanan, klinik dan lingkungan dapat digunakan metode PCR (*Polimerase Chain Reaction*). Metode PCR ini memungkinkan untuk mengidentifikasi, mengkarakterisasi dan menganalisa bagian spesifik dari DNA maupun RNA sampel (Dileep et al, 2003; Kim et al, 1999).

Pada penelitian sebelumnya telah diidentifikasi *V. parahaemolyticus* dari sampel klinis (Marlina et al, 2006) dan sampel kerang jenis *Corbicula moltkiana* (Marlina et al, 2007). Hampir 80% sampel klinis positif mempunyai gen *toxR* dan sekitar 30% sampel bahan makanan juga positif mengandung gen *toxR*. Keberadaan bakteri *V. parahaemolyticus* di air laut diduga juga tinggi karena bakteri ini bersifat halofilik, yaitu bakteri yang mampu hidup pada kondisi garam tinggi. Karena pantai sering digunakan sebagai tempat rekreasi oleh masyarakat, maka sangat penting untuk mengetahui keberadaan bakteri ini di pantai yang terdapat di sekitar kota Padang, yaitu Pantai Bungus dan Pantai Pasir Jambak .

Dalam usaha untuk melengkapi informasi dan pengembangan ilmu biologi molecular, terutama deteksi gennya sebagai penghasil toksin yang berbahaya pada manusia, maka penelitian ini

bertujuan melengkapi data karakterisasi bakteri *V. parahaemolyticus* pada tingkat molecular yang berasal dari Sumatera Barat khususnya dan Indonesia pada umumnya.

Alat dan Bahan

Alat

Mesin PCR/ thermal cycler (Perkin Elmer, Gene AMP PCR. 2400), perangkat elektroforesa (CBC-scientific), Gel Documentation (Biorad), film polaroid (tipe 665), Biolog System dan perangkat MicroStation, autoklaf (All American), Rotary Shaker Inkubator (Thermolyne), pipet mikro, spatel, gelas ukur, gelas piala, cawan petri, kapas lidi steril, jangka sorong, erlenmeyer, pinset steril, jarum ose, tabung reaksi, tabung eppendorf (1,5ml), botol universal, alumunium foil, Laminar Air Flow (ESCO®), Inkubator (Gallenkamp®), Centrifuge (5415D) lemari pendingin (Panasonic).

Bahan

Sampel air laut diambil dari Pantai Bungus dan Pasir Jambak, Padang, Sumatra Barat, media Alkaline Pepton Water (APW), media CHROM agar Vibrio (CHROM agar™), media Luria Burtani (LB) broth, Natrium Chlorida, aquadest steril, KOH 3,0%, Oxidase test strip, Hydrogen peroksida 3,0%, GN Inoculation Fluid, alkohol 70%, buffer PCR 10 x 25 mM MgCl, 10 mM d NTPs (Deoksi Nukleotida Trifosfat), *Primer*, *Taq Polimerase*, DNA template, agarosa dan ethidium bromide.

Prosedur Kerja

Semua bahan dan alat yang digunakan disterilkan dengan autoklaf pada 121^0C selama 15 menit dan semua pengerjaan dilakukan secara aseptis.

Penyiapan dan Pembuatan Media

Media Alkaline Peptone Water

Media Alkaline Pepton Water dibuat dengan melarutkan 10 g pepton dan 10 g NaCl dalam 1 L air suling dalam erlenmeyer, kemudian dipanaskan sampai homogen dan mendidih, disterilkan dengan autoklaf pada tekanan 15 lbs pada suhu 121^0C selama 15 menit.

Media CHROMagar *Vibrio* (CHROMagar™)

Media CHROMagar *Vibrio* ditimbang 74,4 g, lalu dilarutkan dalam 1 L air suling dalam erlenmeyer steril, dipanaskan sambil diaduk sampai terbentuk suatu masa yang homogen, didihkan 1 – 2 menit, tuang pada cawan petri sebanyak 15 ml tanpa disterilisasi.

Media Luria Burtani (LB) Broth

Pembuatan Media Luria Burtani (LB) Broth dibuat dengan melarutkan 5 gram yeast ekstrak, 10 gram NaCL dan 10 gram tripton dalam 1 L air suling dalam erlenmeyer kemudian dipanaskan sedikit sambil diaduk hingga homogen lalu sterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C pada tekanan 15 lbs selama 15 menit.

Pembuatan media Luria Burtani (LB) Agar

Media Luria Burtani Agar dibuat dengan cara melarutkan 5 g yeast ekstrak, 20 g NaCl, 10 g tripton dan 10 gram agar di dalam 1 liter aquadest steril di dalam erlenmeyer steril, dimasukkan 5 ml pada botol universal dan disterilkan pada suhu 121°C pada tekanan 15 lbs selama 15 menit.

Isolasi bakteri *Vibrio parahaemolyticus*

Sampel air laut diambil pada tiga titik di Pantai Bungus dan Pantai Pasir Jambak, masing masing dilakukan tiga kali pengulangan.

Sebanyak 25 ml sampel dimasukkan ke dalam erlenmeyer steril yang berisi 225 ml media Alkaline Pepton Water (APW). Ditutup dengan kapas steril, dihomogenkan. Kemudian diinkubasi dalam *water bath* pada suhu 37°C selama 6-8 jam. Setelah sampel diinkubasi, diambil satu jarum ose kemudian digoreskan ke medium TCBS, diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Koloni yang diduga *V.parahaemolyticus* yaitu koloni yang berwarna hijau dengan ukuran 1 – 2 mm, ditanam pada media CRHOMagar Vibrio dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Timbulnya warna ungu pada media menandakan bakteri tersebut adalah *V. parahaemolyticus*.

Identifikasi *Vibrio parahaemolyticus* dengan Metode *Biolog*

Test pengelompokan bakteri dengan menggunakan pereaksi KOH 3%

Satu tetes KOH 3% dicampurkan dengan 1 ose koloni bakteri *V. parahaemolyticus* diatas kaca objek. Dengan bantuan jarum ose suspensi tersebut ditarik. Terbentuknya suspensi yang kental (seperti lendir) dan melengket pada jarum ose menunjukkan bahwa bakteri tersebut adalah bakteri gram negatif, sedangkan apabila suspensi yang terbentuk adalah suspensi encer maka bakteri tersebut adalah bakteri gram positif.

Uji Oxidase dengan menggunakan Oxidase Test Strip

Sebanyak 1 ose koloni bakteri yang diduga *V. parahaemolyticus* diambil dari medium NA, kemudian digoreskan pada kertas Oxidase Test

Strip. Perubahan warna yang terjadi pada test strip tadi diamati setelah didiamkan selama 20-60 detik. Apabila terjadi perubahan warna menjadi biru violet maka oxidase test dinyatakan positif dan menandakan bahwa bakteri tersebut adalah bakteri non enterik. Sedangkan bila tidak terjadi perubahan warna maka oxidase test dinyatakan negatif dan menandakan bakteri tersebut adalah bakteri enterik.

Uji Katalase

Koloni bakteri yang diduga *V. parahaemolyticus* dari media NA diambil sebanyak 1 ose, kemudian digoreskan diatas kaca objek yang kering. Hidrogen Peroksida diteteskan sebanyak 2-3 tetes pada usapan bakteri tadi. Apabila terbentuk gelembung udara maka uji katalase dinyatakan positif. Baktei aerob memberikan reaksi yang posistif terhadap uji katalase sedangkan anaerob tidak menunjukkan reaksi yang positif.

Identifikasi bakteri dengan metoda *Biolog*

a. Kultur murni bakteri yang telah di tanam pada NA disiapkan.
b. Inokulum bakteri disiapkan dan diukur transmitantnya.
   Koloni bakteri diambil dengan menggunakan kapas lidi steril, kemudian suspensinya dibuat dengan menggunakan larutan Gram Negatif (GP) *Inoculation Fluid*. Transmitant dari suspensi tadi diukur dengan menggunakan Biolog Turbidimeter (Nonenteric 52% range ± 2%). Apabila transmitant yang dihasilkan kecil maka diencerkan kembali dengan penambahan inoculation fluid. Apabila transmitant besar maka koloni bakterinya ditambahkan kembali. Suspensi tersebut kemudian dituang ke dalam cawan petri
c. Dengan menggunakan mikropipet, suspensi tadi dipipet sebanyak 150µl kemudian dimasukkan kedalam tiap lubang GN2 MikroPlate™. Mikroplate kemudian diinkubasi selama 16-24 jam.
d. Setelah diinkubasi, MikroPlate dimasukkan ke dalam MicroStation Reader. Dengan menggunakan Pre-loaded ID data Base yang terdapat didalam komputer yang terprogram maka proses identifikasi akan segera berlangsung, dan hasilnya akan ditampilkan pada monitor dan hasilnya akan diprint. Hasil ini berupa daftar 1-10 spesies yang memiliki pola reaksi yang berdekatan lengkap dengan persentasenya.

Deteksi gen toxR bakteri *V. parahaemolyticus* secara PCR

Ekstraksi Genom DNA

Genom DNA *V. parahaemolyticus* diekstraksi dengan metoda Boil Cell Extraction (BCE). Sejumlah 1 ml kultur dipindahkan kedalam tabung eppendorf, lalu disentrifus pada 10.000 rpm selama 5 menit, supernatan dibuang, endapan disuspensikan dalam 1 ml aquadest steril lalu divorteks. Panaskan dalam air mendidih selama 10 menit. Selanjutnya diinkubasi 10 menit dalam lemari pendingin dengan suhu -20°C kemudian disentrifus pada 10.000 rpm selama 5 menit, supernatan dipindahkan kedalam eppendrof baru dan cairan ini digunakan untuk proses PCR.

Sebanyak 2µl template DNA dicampur dengan pereaksi PCR yaitu 10 x PCR buffer PCR, 25 mM $MgCl_2$, *Primer* 1 *Primer* 2, 10 mM dNTPS (Deoksi Nukleotida Trifosfat) dan enzim *Taq Polymerase* Di dalam eppendorf 0,2ml. Mesin PCR telah diprogram masing masing sebagai berikut: predenaturasi 96°C (5 menit), denaturasi 94°C (1 menit), annealing (Pengikatan) pada 63°C (1,5 menit), extension (pemanjangan) 72°C (1,5 menit) elongation (pemanjangan akhir) 72°C (7 menit). Semua proses berjalan selama 20 siklus.

Elektroforesa

Teknik elektroforesa dilakukan pada gel agarosa 1.2% menggunakan TBE 1x pada tegangan 150 Volt selama 5 menit, kemudian dilanjutkan pada tegangan 80 Volt selama 50 menit untuk mengidentifikasi gen toxR pada campuran setelah proses PCR selesai. Untuk memudahkan pengamatan, gel diwarnai dengan 0.5 µg/ml larutan editium bromida selama 5-10 menit dan dilihat gambarannya dengan DNA Gel Documentation System. Pada photo dapat dilihat pola pemisahan pita-pita DNA yang ukurannya diketahui melalui perbandingan dengan ukuran pita-pita standar "1 Kb DNA ladder", dimana ukuran pita-pita DNA *V. parahaemolyticus* untuk *toxR* adalah 368 bp,

Hasil dan Pembahasan

V. parahaemolyticus merupakan bakteri halofilik yang mempunyai habitat nya di air, terutama air dengan konsentrasi tinggi seperti air laut (Tantillo et al, 2004; Wong et al, 2000). Dari hasil isolasi air laut pantai Pasir Jambak dan Bungus, Padang diperoleh 18 kultur tunggal warna ungu pada media CHROMAgar Vibrio yang diduga adalah *V. parahaemolityeus*. CHROMAgar Vibrio adalah media selektif untuk bakteri genus Vibrio, media

ini mengandung senyawa kromogenik yang dapat membedakan beberapa spesies dalam genus Vibrio (Hara-Kudo *et al*., 2001).

Gambar 1: Isolat *Vibrio parahaemolyticus* hasil isolasi pada media CHROMAgar Vibrio

Proses identifikasi dan konfirmasi selanjutnya dilakukan terhadap 3 kultur hasil isolasi, dengan menggunakan metode *Biolog*. Diperoleh hasil persentase *probability* bakteri *V. parahaemolyticus* 68,%, 78%, 85%.

Data print out dari Microstation Reader menunjukkan 10 kemungkinan species bakteri yang diuji, dimana *V. parahaemolyticus* memberikan hasil kemungkinan 85% dan muncul pada baris pertama . Pada baris kedua *V. vulvialis* dengan persen *probability* 14%. Sedangkan kemungkinan yang lain adalah *V. alginolyticus*, tetapi memberikan data persen *probability* 0%.

Rangkaian pengujian metode biolog yaitu uji pengelompokan bakteri, uji oksidase, uji katalase, penyiapan inokulum dan penginokulasian ke dalam mikroplate serta pembacaan hasil inokulasi dalam mikroplate (David, 2001). Uji pengelompokan bakteri yaitu dengan menggunakan KOH 3%. Terbentuk suspensi yang kental seperti lendir. Ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut adalah bakteri gram negatif. Lendir yang terbentuk merupakan hasil dinding sel bakteri yang pecah karena penambahan KOH 3%. Dinding sel bakteri gram negatif lebih tipis dibandingkan dinding sel gram positif, jadi dengan hanya penambahan KOH 3% dapat mendestruksi dinding sel bakteri gram negatif.

Uji oksidase bertujuan untuk menentukan bakteri enterik atau non enterik. Enzim sitokrom oksidase akan berubah menjadi bentuk tidak aktif dengan mereduksi sitokrom c. Enzim ini akan menjadi bentuk aktifnya kembali jika terjadi transfer elektron ke molekul oksigen. Keberadaan oksigen pada enzim oksidase akan mereduksi substan-substan organik diantaranya substan yang terdapat pada *oxidase test strip* yang mengandung N,N-dimetil-1,4-fenilen diammonium diklorida dan 1-naftol. Reaksi tersebut akan menghasilkan molekul *indophenol blue* yang mengakibatkan warna *test strip* akan berwarna biru. Ini merupakan reaksi positif untuk bakteri non enterik sedangkan pada bakteri enterik tidak terjadi perubahan warna.

Uji katalase digunakan untuk mendeteksi adanya enzim katalase. Enzim ini terdapat pada sel-sel yang mempunyai metabolisme aerobik. Bakteri anaerob tidak mempunyai enzim katalase. Reagen yang digunakan sebagai pereaksi mengandung 3% larutan Hidrogen peroksida. Enzim katalase akan bereaksi dengan hydrogen peroksida yang menghasilkan gas (oksigen). Bakteri yang positif katalase ditandai terbentuknya gelembung udara pada kaca objek (David and Janet, 2001).

Penyiapan inokulum untuk diisikan ke dalam mikroplate dilakukan dengan cara mensuspensikan koloni bakteri yang diduga *V. parahaemolyticus* ke dalam larutan inokulasi gram negatif. Kemudian transmitan diukur dengan menggunakan Biolog Turbidimeter dimana range transmitan bakteri gram negatif non-enterik adalah 52% ± 2%. Sebanyak 150 µl suspensi bakteri tersebut diisikan ke dalam 95 lubang mikroplate yang mengandung sumber karbon yang berbeda. Suspensi bakteri ini kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Setelah itu dilakukan pembacaan hasil dengan menggunakan *MicroStation Reader* (MicroLog™). Disetiap lubang mikroplate terdapat tetrazolium yang digunakan sebagai indikator yang akan tereduksi oleh reaksi yang terjadi antara bakteri dengan karbon yang ada pada masing-masing lubang mikroplate. Tetrazolium akan berubah menjadi ungu jika direduksi. Reaksi tersebut terjadi secara bersamaan dan mempunyai ciri khas tersendiri, sehingga disebut sebagai "metabolic fingerprint". Kemudian "metabolic fingerprint" akan dibandingkan dengan database yang ada dalam software *MicroStation Reader* (MicroLog™)..

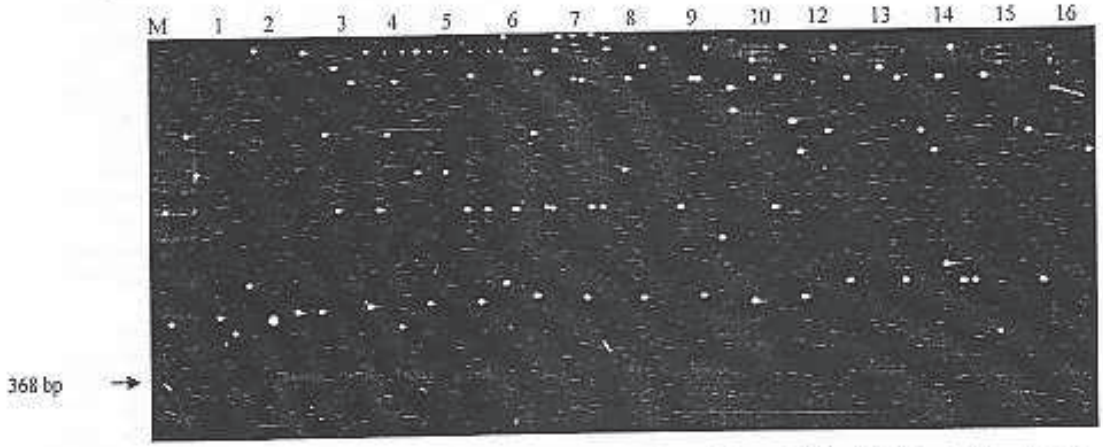
Tabel 1 : Hasil pembacaan dengan Microstation Reader identifikasi kultur *V. parahaemolyticus* dengan metode Biolog pada 96 lubang microplate.

Got	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	<227>	<440>	<239>	<389>	<337>	50	<430>	15	{66}	20	21
B	10	<410>	15	<230>	16	<498>	28	17	21	<416>	<404>	<603>
C	13	<624>	49-	16	17	<223-	<458-	<472>	42-	15	<315>	<260>
D	27	23	20	44	16	41	<394>	15	{100}	12	{87}	11
E	7	4	25	32	34	<353>	19	{100}	19	22	5	<486>
F	<143>	29	12	31	<120>	<123>	<319>	<398>	<485>	<442>	{83}	{101}
G	<341-	34	{79}	24	15	<264>	15	-1	<220>	<303>	13	16
H	24-	<385>	<264>	<187>	10	42	24	14	<163>	35	28	<454>

Tabel 2 : Data print out dari Microstation Reader kemungkinan 10 species bakteri yang paling mendekati dari database pada *Biolog* System

No.	Species	% Probability	Similarity
1.	*Vibrio parahaemolyticus*	85	0,52
2.	*Vibrio fluvialis*	14	0,06
3.	*Vibrio alginaeticus*	0	0,00
4.	*Aeromonas enchelein*	0	0,00
5.	*Listonella anguillarum*	0	0,00
6.	*Aeromonas hydrophila DNA group1*	0	0,00
7.	*Vibrio metschnikovii*	0	0,00
8.	*Vibrio aestuarianus*	0	0,00
9.	*Vibrio carcariae*	0	0,00
10.	*Vibrio diazotrophicus*	0	0,00

Dari hasil deteksi gen *toxR* pada kultur bakteri *V. parahaemolitycus* hasil isolasi, berhasil dideteksi 14 kultur mempunyai gen *toxR*. Hasil ini sesuai dengan informasi sebelumnya bahwa hany sekitar 10-30% bakteri V. parahaemolyticus dari sampel lingkungan yang mengandung gen *toxR* (Nishibuchi, 2004).



Gambar 2: Hasil elektroforesa gen *toxR* kultur *V. parahaemolyticus* hasil isolasi dari air laut pada gel agarosa 1,2%

Keterangan: 1-15: kultur bakteri *V. parahaemolyticus* hasil isolasi
16 : kontrol positif bakteri *V. parahaemolyticus* 1808
M : Marker Ladder 1Kbp

Dari hasil deteksi gen *toxR* pada kultur bakteri *V. parahaemolityicus* hasil isolasi, diperoleh hasil 8 kultur mempunyai gen *toxR* dari 14 kultur yang diperiksa. Tidak terdeteksinya gen *toxR* pada kultur yang telah positif dan berwarna ungu pada media CHROMAgar, kemungkinan kultur tersebut terkontaminasi oleh Vibrio lain, karena primers hanya akan bereaksi dengan DNA dari kultur *V. parahaemolyticus* saja.

Proses yang terjadi pada mesin PCR adalah denaturasi DNA dengan suhu yang tinggi (94°C) sehingga rantai DNA yang berupa rantai ganda yang berpilin menjadi helaian tunggal yang terputus-putus. Gen target terputus menjadi dua buah helaian tunggal yaitu rantai basa nukleotida 1 dan rantai basa nukleotida 2. Rantai basa nukleotida 1 diikat oleh *primer* 1 dari arah 3' (tiga aksen) ke 5' (lima aksen) dan rantai basa nukleotida 2 diikat oleh *primer* 2 dari arah 3' ke 5' juga. Dengan adanya enzim *Taq Polymerase*, $MgCl_2$ sebagai kofaktor, dan dNTP's (d-ATP, d-CTP, d-GTP, d-TTP) sebagai suplai nukleotida, primer yang tersusun dari kurang lebih 13 basa nukleotida akan diperpanjang sehingga jumlahnya sama dengan rantai basa nukleotida 1 dan 2 membentuk dua buah gen yang sempurna. Proses ini berlangsung pada satu kali siklus, apabila tedapat 20 siklus maka gen yang terbentuk adalah 2^{20} = 1048576 atau dirumuskan 2^n (n=jumlah siklus). Setelah proses menggunakan mesin PCR selesai, dilakukan elektroforesa gel untuk melihat pola pemisahan pita DNA (Wong *et al*, 2001).

Kesimpulan

Metode Biolog dan PCR dapat digunakan sebagai metode konfirmasi dalam mengidentifikasi bakteri *V. parahaemolyticus* hasil isolasi, dimana metode PCR lebih spesifik dibandngkan metode *Biolog* karena dapat mendeteksi sampai tingkat gen.

Daftar Pustaka

Alam, M. J., Miyoshi, S. I. And Shinoda, S. 2003. Studies on pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* during a warm weather season in Seto Inland Sea, Japan. *Environmental Microbiology* 5:706-710

Alcamo, E. I, *Fundamental of Microbiology*, 4rd Ed, The Benjamin, Cummings Publishing Inc, California, 1995Nontji. Anugerah, *Laut Nusantara*, Penerbit Djambatan, Jakarta, 1995.

Cordova, J. L., J. Astorga, W. Silva, and C. Riquelme, "Characterization by PCR of *Vibrio parahaemolitycus* isolates collected during the 1997-1998 Chilean outbreak", *Biological Research*. 35. 2002. 433-440

David, J. C, Jannet I.,Comparison of Vitek® 32 and Microlog® ML3 System for Identification of Select Biological Warfare Agents, Armed Force Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington, DC, 2001de Nogueira L., Bittrich, V.P.C., Shepherd, G. J., Lopes A. V., and Marsaioli, A. J. 2001.

De Paola, A., J. Ulaszek, C. A. Kaysner, and B. J. Tenge. "Molecular, Serological, and Virulence Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from Environmental, Food, and Clinical Sources in North America and Asia", *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 2003, 3999-4005

Dileep, V., Kumar, H.S., Kumar, Y., Nishibuchi, M., Karunasagar, I. and Karunasagar, I. 2003. Application of polymerase chain reaction for detection of *Vibrio parahaemolyticus* associated with tropical seafoods and coastal environment. *Letters in Applied Microbiology* 36:423-427.

Hara-Kudo, Y., Nishina, Y., Nakagawa, H., Konuma, H., Hasegawa, J. and Kumagai, S. Detection of TDH-producing *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 from naturally contaminated shellfish with immunomagnetic separation method and a chromogenic agar medium. *Kansenshogaku Zasshi* 2001.75:955-960.

Kim, Y. B., J. Okuda, C. Matsumoto, N. Takahashi, S. Hashimoto, and M. Nishibuchi, "Identification of *Vibrio parahaemolityicus* Strains at the Species Level by PCR Targeted to the toxR Gene", *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 1999, 1173-1177

Marlina, Zulqifli, Anamerta, L., Revadiana, I., Radu, S., Kqueen, C. Y. and Nishibuchi, M. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* from clinical samples in West Sumatera Using Polymerase Chain Reaction Methods. *Acta Pharmaceutica Indonesia* 31 (2): 2006, 96-99.

Marlina, Radu, S., Kqueen, C. Y., Napis, S., Zakaria, Z., Mutalib, S. A. and Nishibuchi, M. Occurrence of *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolated from *Corbicula moltkiana* Prime in West Sumatera, Indonesia. *Southeast Asian Journal of Tropical Medical Public Health* Vol.38 No. 2 March 2007.

Nishibuchi, M. *Vibrio parahaemolyticus*. In *International handbook of foodborne pathogens*, ed. M.D. Milliots and J.W.

Bier.United States: Marcel Dekker, Inc. 2004. p. 237-252

Pelczar, M J and Roger, D.. *Microbiology: 2nd Ed.* Megraw-Hill Company. New York. 1965

Provenzano, D., D. A. Seuhmacher, J. L. Barker, and K. E. Klose, "The Virulence Regulatory Protein ToxR Mediates Enhanced Bile Resistance in *Vibrio Cholerae* and Other Pathogenic *Vibrio* Species", *Journal of Clinical Microbiology*, 12, 1999, 7758-7763.

Tang, Y. W., Elis, N. M., Hopkins, M. K., Dodge, D. E.,and D. H. Persing., "Journal Comparison of Phenotypic and Genotypic Techniques for Identification of Unusual Pathogenic Aerobic Gram Negatif Bacilli", *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 3674 – 3679, 1998

Tantillo, G.M., Fontanarosa, M., Di Pinto, A. and Musti, M. Updated perspectives on emerging vibrios associated with human infections. *Letters in Applied Microbiology* 2004, 39:117-126.

Wong, H.C., Liu, S.H., Wang, T.K., Lee, C.L., Chiou, C.S., Liu, D.P., Nishibuchi, M. and Lee, B.K. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 from Asia. *Applied and Environmental Microbiology* 2000, 66:3981-3986.

Wong, H. C. and Lin, C. H. Evaluation of Typing of *Vibrio parahaemolyticus* by Three PCR Methods Using Specific Primers. *Journal of Clinical Microbiology* 2001, 39: 4233-4240.

Yuherman, Molecular Characterization of Vibrio Species Isolated From Sea Water, P.hD *Thesis*, Faculty of Food and Biotechnology, Universitas Putra Malaysia, Selangor, Malaysia,2001