

DETEKSI GEN *tlh* DAN *tdh* PADA Bakteri *Vibrio*
parahaemolyticus DARI AIR TAMBAK UDANG VANNAME
(*Litopenaeus vannamei*) DI KABUPATEN REMBANG

Adila Nawan Hasrimi, Anto Budiharjo, Siti Nur Jannah

Laboratorium Bioteknologi

Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Semarang
Jalan Prof. Soedarto, SH, Semarang, 50275, Telp: (024)7474754; Fax (024) 76480923

Email : nawan.adila24@gmail.com

ABSTRACT

Vibrio parahaemolyticus is halophilic gram-negative bacteria that live as natural inhabitant in aquatic environment. All *Vibrio parahaemolyticus* strain known to have *thermolabile hemolysin* encoded by *tlh* gene as species marker. *Thermostable direct hemolysin* encoded by *tdh* gene is responsible for regulating one of the virulence factors in *Vibrio parahaemolyticus*. The aim of this research is to detect *tlh* gene and *tdh* gene from water of vanname shrimp's aquaculture in Rembang regency. Colonies of green-blueish bacteria grew from the isolation of vanname shrimp's aquaculture water in CD-VP media which is identified as *Vibrio parahaemolyticus*. The isolated bacteria is specifically identified as *Vibrio parahaemolyticus* bacteria by the detection of *tlh* gene. Molecular analysis shows *tdh* negative result that indicates *tdh* gene is not present in the isolated bacteria. *Vibrio parahaemolyticus* isolate were cultured in Wagatsuma agar for the *tdh* gene confirmation test that showed Kanagawa negative result, in which indicated that *V. parahaemolyticus* did not produce *thermostable direct hemolysin*. *Vibrio parahaemolyticus* isolate did not show any virulence factors to initiate host colonization in the aquatic environment.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, *tdh* gene, *tlh* gene

ABSTRAK

Vibrio parahaemolyticus merupakan bakteri halofilik gram negatif pada lingkungan akuatik. Semua strain *Vibrio parahaemolyticus* memiliki *thermolabile hemolysin* yang diregulasi oleh gen *tlh*. *Thermostable direct hemolysin* yang diregulasi oleh gen *tdh* adalah salah satu faktor virulensi utama pada *Vibrio parahaemolyticus* yaitu. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendeteksi keberadaan gen *tlh* dan *tdh* pada bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dari air tambak udang vanname di Kabupaten Rembang. Isolasi bakteri dari air tambak udang vanname pada media CD-VP menunjukkan pertumbuhan koloni bakteri berwarna hijau-kebiruan yang teridentifikasi spesifik sebagai bakteri *Vibrio parahaemolyticus*. Isolat bakteri teridentifikasi sebagai bakteri spesies *Vibrio parahaemolyticus* berdasarkan penyandi gen *tlh*. Analisis molekuler menunjukkan hasil *tdh* negatif, yang mengindikasikan bahwa bakteri tidak memiliki gen *tdh* untuk menyandi *thermostable direct hemolysin* yang menentukan faktor virulensi. Uji konfirmasi gen *tdh* pada isolat bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dengan media agar wagatsuma menunjukkan hasil Kanagawa negatif yang mengindikasikan bahwa bakteri tidak menghasilkan *thermostable direct hemolysin*. Isolat *Vibrio parahaemolyticus* tidak mempunyai faktor virulensi untuk memulai kolonisasi pada organisme inang di lingkungan akuatik ini.

Kata kunci: *Vibrio parahaemolyticus*, gen *tdh*, gen *tlh*

PENDAHULUAN

Perkembangan budidaya udang vanname secara komersial diiringi dengan meningkatnya resiko infeksi penyakit yang disebabkan oleh patogen oportunistik. *Vibrio parahaemolyticus* merupakan bakteri halofilik gram negatif yang secara alami terdapat pada lingkungan akuatik (Xie *et al*, 2005). Bakteri *V. parahaemolyticus* pada lingkungan akuatik dapat menginfeksi udang vanname melalui luka pada eksoskeleton dan akan menyebar melalui hemolymph pada sistem sirkulasi udang vanname (Soto-Rodriguez *et al*, 2015).

Udang vanname merupakan salah satu agen transmisi bakteri *V. parahaemolyticus* menuju inang manusia. Menurut Alam *et al* (2002), *V. parahaemolyticus* merupakan salah satu penyebab utama dari 20-30% kasus gastrointestinal pada manusia yang terjadi di negara-negara Asia termasuk Jepang, Hong Kong, Thailand, dan Indonesia. Bakteri *V. parahaemolyticus* dapat masuk ke sistem gastrointestinal manusia melalui konsumsi udang vanname mentah atau kurang matang yang telah terinfeksi *V. parahaemolyticus* (Faruque, 2012). Bakteri *V. parahaemolyticus* yang telah menemukan kondisi optimal di bagian gastrointestinal manusia akan memulai kolonisasi organisme inang untuk mendapat nutrisi dengan tujuan mempertahankan pertumbuhannya (Labbe dan Garcia, 2013).

Vibrio parahaemolyticus menghasilkan hemolisin yang merupakan enterotoksin penyebab kerusakan pada sel darah organisme yang terinfeksi. Gen *tlh* menyandi *thermolabile hemolysin* sebagai marker spesifik untuk mengidentifikasi spesies *V. parahaemolyticus* (Nordstorm *et al*, 2007). Namun gen *tlh* belum dapat spesifik menentukan fungsi virulensi

pada *V. parahaemolyticus* (Bej *et al*, 1999). Bakteri *V. parahaemolyticus* memiliki beberapa faktor virulensi termasuk *adhesin*, *thermostable direct hemolysin (tdh)*, dan *TDH related hemolysin (trh)*. Gen *tdh* menyandi *thermostable direct hemolysin* yang merupakan salah satu faktor virulensi utama pada *V. parahaemolyticus* (DePaola *et al*, 2003).

Metode analisis secara molekuler dengan menggunakan PCR merupakan metode yang efektif untuk mendeteksi adanya gen *tlh* dan gen *tdh* pada *V. parahaemolyticus*. Karakterisasi genetik ini digunakan sebagai dasar untuk mengetahui virulensi bakteri *V. parahaemolyticus* yang terdapat pada air tambak udang vanname di Kabupaten Rembang.

METODE PENELITIAN

Pengambilan Sampel

Pengambilan air tambak udang vanname di Kabupaten Rembang dilakukan di bulan November pada umur tambak ± 50 hari. Sampel air diambil dari salah satu lokasi tambak udang vanname yang berada di Kabupaten Rembang. Air tambak yang diambil dimasukkan ke dalam botol sebanyak 500 ml. Sampel air tambak yang telah diambil disimpan ke dalam *ice box* untuk dibawa ke laboratorium.

Isolasi *Vibrio parahaemolyticus*

Tahap isolasi *V. parahaemolyticus* bertujuan untuk mendapatkan isolat strain *V. parahaemolyticus* yang akan digunakan untuk proses ekstraksi DNA. 1 ml sampel air dengan pengenceran 10^2 diletakkan pada media *Compact Dry VP* (CD-VP), kemudian diinkubasi pada suhu $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam. Koloni diamati berdasarkan perbedaan warna koloni bakteri yang tumbuh. Koloni berwarna hijau-kebiruan yang tumbuh

pada media CD-VP merupakan *Vibrio parahaemolyticus*. Koloni yang sudah tumbuh kemudian diisolasi dengan cara di-*streak* dan dipindahkan pada media agar thiosulfate citrate bile salts sucrose (TCBS) dan dibedakan berdasarkan perbedaan warnanya. Kultur koloni hasil isolasi yang sudah tumbuh kemudian di-*streak* dan dipindahkan pada mikrotube ukuran 2 ml. 500 µl aquades steril dimasukkan pada mikrotube 2 ml, kemudian divortek selama 30 detik. Setiap mikrotube diberi label sampel (Kodaka *et al*, 2009 dengan modifikasi).

Kontrol positif dan kontrol negatif ditumbuhkan pada media CD-VP. Kontrol positif yang digunakan adalah *Vibrio parahaemolyticus* dari Balai Besar Perikanan dan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara. Kontrol negatif yang digunakan merupakan *Bacillus pumilus* dari Laboratorium Bakteriologi UPT Laboratrium Terpadu Undip. Pewarnaan Gram dilakukan untuk menentukan jenis bakteri yang digunakan dalam penelitian. Preparat isolat hasil pewarnaan gram diamati dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x.

Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA *Vibrio parahaemolyticus* dilakukan menurut protokol ekstraksi DNA Qiamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) untuk kultur bakteri yang meliputi tahap penghancuran, penghilangan RNA dan protein, dan tahap pemurnian.

Tahap penghancuran dimulai dengan meletakkan sampel pada suhu ruangan. 500 µl buffer AL ditambahkan ke dalam eppendorf tube yang telah berisi sampel, sampel kemudian divortek selama 30 detik, tabung eppendorf dibolak-balik sebanyak lima kali, dan divortek selama 30 detik. Sampel diinkubasi selama 5 menit dalam suhu ruang. 200 µl etanol dingin ditambahkan, kemudian dikocok dan divortek selama 30 detik. Larutan (±

500-600 µl) ditransfer ke dalam tube penampung DNA (tube dengan filter), selanjutnya disentrifuge pada kecepatan 8000 rpm selama 30 menit. Larutan dibawah filter dibuang.

Tahap penghilangan RNA, protein, dan komponen lain dilakukan dengan menambahkan 500 µl buffer AW1, kemudian dicentrifuge selama 1 menit pada kecepatan 8000 rpm. Larutan yang ada di dalam tabung collumn dibuang. Selanjutnya 500 µl buffer AW2 ditambahkan, kemudian dicentrifuge selama 3 menit pada kecepatan 14500 rpm. Buffer AW2 digunakan untuk membersihkan lagi. Larutan di dalam tabung dibuang. Tabung dicentrifuge pada kecepatan 14500 rpm selama 1 menit untuk mengeringkan filter. Tabung collumn yang berfilter dipindahkan ke dalam tabung penampungan DNA (eppendorf tube tanpa filter) yang baru.

Tahap pemurnian dilakukan dengan menambahkan 100 µl buffer AE. Tabung column diinkubasi selama 1 menit, lalu dicentrifuge selama 1 menit pada kecepatan 8000 rpm untuk memperoleh DNA. Buffer AE digunakan untuk melarutkan DNA agar turun dari filter. Sampel dibagi menjadi sampel untuk kerja dan sampel untuk stok. DNA disimpan pada suhu 4°C untuk penyimpanan jangka waktu pendek dan pada suhu -20°C atau -80°C untuk penyimpanan jangka waktu yang lebih lama. Tahap uji kuantitatif larutan DNA dilakukan dengan menggunakan alat nanodrop spektrofotometer (Thermo Scientific, USA).

Amplifikasi DNA

Amplifikasi gen *tdh* menggunakan primer *forward* *tdh86F* (5'-CTGTCCCTTTTCCTGCCCCCG-3') dan primer *reverse* *tdh331R* (5'-AGCCAGACACCGCTGCCATTG-3') (West *et al*, 2013). Amplifikasi gen *tlh* menggunakan primer *forward* *tlh-f* (5'-CATTACTCCCGCTTGCTTCTG-3') dan primer *reverse* *tlh-r* (5'-

CGGAACATAGGTATAGGTTTGGTT-3') (Vinoj *et al*, 2014). Campuran reaksi PCR berupa 50 µl MyTaq HS Red DNA Polymerase PCR Kit (Meridian Bioscience Asia, Singapore, Singapore), yang terdiri dari ddH₂O, 5X MyTaq Red Reaction buffer, 20 µM primer forward, 20 µM primer reverse, 1 U/µl MyTaq HS Red DNA Polymerase, dan DNA template. Tahap amplifikasi menggunakan isolat DNA bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dari BBPBAP Jepara dan isolat DNA bakteri *Bacillus pumilus* dan aquades.

Proses siklus termal untuk gen *tlh* terdiri atas tahap denaturasi awal pada suhu 95°C selama 3 menit, diikuti dengan 35 siklus amplifikasi yang meliputi denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, annealing pada suhu 60°C selama 45 detik, dan elongasi pada suhu 72°C selama 30 detik, dan yang terakhir adalah elongasi akhir pada suhu 72°C selama 5 menit (Vinoj *et al*, 2014). Produk PCR yang diperoleh disimpan pada suhu -20°C untuk penggunaan lebih lanjut.

Proses siklus termal untuk gen *tdh* terdiri atas tahap denaturasi awal pada suhu 95°C selama 5 menit, diikuti dengan 35 siklus amplifikasi yang meliputi denaturasi pada suhu 95°C selama 1 menit, annealing pada suhu 57°C selama 1 menit, dan elongasi pada suhu 72°C selama 30 detik, dan yang terakhir adalah elongasi akhir pada suhu 72°C selama 2 menit (West *et al*, 2013). Produk PCR yang diperoleh disimpan pada suhu -20°C untuk penggunaan lebih lanjut.

Elektroforesis

Uji kualitatif larutan DNA hasil PCR dilakukan dengan teknik elektroforesis. Agarose dibuat dengan konsentrasi 1% (1 gram agarose yang dilarutkan dengan 100 ml Buffer TAE). 5 µL sampel DNA hasil PCR dimasukkan pada sumuran gel agarose yang telah tersedia. 100 bp marker

diletakkan pada sumuran paling ujung. Running elektroforesis menggunakan voltase 100 volt selama 30 menit. Setelah proses running elektroforesis selesai, gel agarose tersebut direndam di dalam larutan *ethidium bromide* selama 15 menit. Tahap selanjutnya yaitu visualisasi hasil elektroforesis menggunakan GelDoc yang memancarkan sinar UV, sehingga DNA akan terlihat berpendar. Hasil visualisasi DNA menggunakan GelDoc dapat ditransfer ke dalam komputer dalam bentuk gambar.

Analisis Sekuen DNA Produk PCR

Sekuen DNA yang didapatkan dari hasil penelitian dapat dianalisis dengan data serupa yang berasal dari data yang telah dipublikasikan sebelumnya di gene bank. Analisis penyejajaran merupakan salah satu bentuk analisis yang dapat dilakukan. Analisis penyejajaran dapat digunakan untuk membandingkan dua sekuen DNA atau lebih. Program yang digunakan untuk analisis penyejajaran yaitu BLAST (*Basic Local Allignment Search Tools*). Program ini dapat diakses melalui website NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). BLAST merupakan salah satu program yang paling umum digunakan dalam bidang bioinformatik untuk penelitian (Johnson *et al*, 2008).

Uji Konfirmasi Gen *tdh*

Uji Konfirmasi Gen *tdh* dilakukan untuk mengetahui karakteristik virulensi isolat *V. parahaemolyticus* dari air tambak udang vanname di Kabupaten Rembang dengan menggunakan media agar wagatsuma. Isolat *V. parahaemolyticus* dari air tambak udang vanname, isolat *V. parahaemolyticus* dari BBPBAP Jepara, dan *Bacillus pumilus* diinkubasi pada suhu 35°C ± 2°C selama 24 jam. *V. parahaemolyticus* strain patogen akan menunjukkan hemolisis yang membentuk area bening di sekitar koloni

bakteri yang tumbuh di media agar wagatsuma yang dikenal dengan fenomena kanagawa. *Vibrio parahaemolyticus* yang tidak memiliki *thermostable direct hemolysin* tidak menunjukkan munculnya area bening di sekitar koloni bakteri yang tumbuh di media agar wagatsuma (Riemann dan Cliver, 2006).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi *Vibrio parahaemolyticus*

Berdasarkan hasil penelitian ini sampel air yang berasal dari air tambak udang vanname yang dikulturkan pada media CD-VP menunjukkan aktivitas pertumbuhan koloni bakteri berwarna hijau-kebiruan. Kontrol positif menunjukkan aktivitas pertumbuhan koloni bakteri berwarna hijau-kebiruan pada media CD-VP. Kontrol negatif tidak menunjukkan pertumbuhan koloni bakteri pada media CD-VP. Koloni bakteri yang tumbuh berwarna hijau-kebiruan pada media CD-VP merupakan *Vibrio parahaemolyticus*. Hal ini sesuai dengan pernyataan Teramura *et al* (2011), bahwa koloni bakteri berwarna hijau-kebiruan yang tumbuh pada media *Compact Dry VP* merupakan *Vibrio parahaemolyticus*.

Menurut Temamura *et al* (2011), *Compact Dry VP* mengandung agar kromogenik selektif yang terdiri dari media kultur (pepton, NaCl, garam bile, antibiotik) dan dua substrat enzim kromogenik spesifik untuk -glukosidase dan -galaktosidase yang membedakan *V. parahaemolyticus* dengan bakteri lain. Menurut Motarjemi *et al* (2014), koloni bakteri *V. parahaemolyticus* menghasilkan -glukosidase dan -galaktosidase, sehingga tumbuh menjadi koloni bakteri berwarna hijau-kebiruan pada media *Compact Dry VP*. Media CD-VP memiliki senyawa garam *bile* dan antibiotik yang menghambat

pertumbuhan bakteri gram positif. Berdasarkan karakteristik tersebut menunjukkan bahwa media CD-VP sebagai media selektif untuk mengidentifikasi *V. parahaemolyticus*.

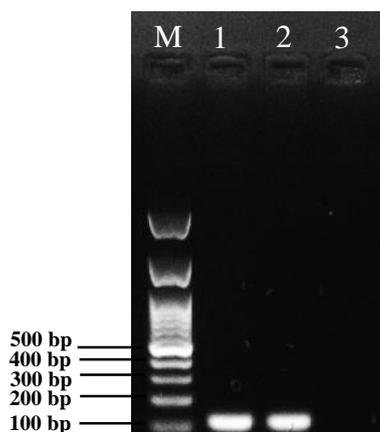
Koloni tunggal bakteri *V. parahaemolyticus* dari media CD-VP diisolasi untuk ditumbuhkan pada media agar *thiosulfate citrate bile salts sucrose* (TCBS). Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa koloni bakteri *V. parahaemolyticus* pada media TCBS tumbuh menjadi koloni berukuran kecil berwarna hijau-kebiruan, dengan struktur tebal dan lengket. Menurut Nelapati *et al* (2011), *V. parahaemolyticus* merupakan bakteri yang tidak dapat memfermentasikan sukrosa sehingga menghasilkan koloni bakteri berwarna biru-kehijauan pada media agar TCBS, sedangkan bakteri *Vibrio* yang dapat memfermentasikan sukrosa akan membentuk koloni berwarna kuning pada media agar TCBS.

Identifikasi Molekuler *Vibrio parahaemolyticus*

Identifikasi molekuler dilakukan untuk mendeteksi gen *tlh* (*thermolabile hemolysin*) dan gen *tdh* (*thermostable direct hemolysin*) pada isolat *Vibrio parahaemolyticus*. Menurut Nordstorm *et al* (2007), gen *tlh* merupakan marker spesifik untuk spesies *Vibrio parahaemolyticus* dan gen *tdh* meregulasi faktor virulensi pada *V. parahaemolyticus*. Identifikasi molekuler *V. parahaemolyticus* dari hasil isolasi air tambak udang vanname di Kabupaten Rembang diawali dengan ekstraksi isolat bakteri *V. parahaemolyticus* yang ditumbuhkan pada media TCBS. Metode ekstraksi DNA dalam penelitian ini menggunakan metode Qiamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany).

Uji kuantitatif ekstrak DNA *Vibrio parahaemolyticus* dari isolat air tambak

udang vanname menunjukkan konsentrasi DNA sebesar 971,7 ng/ μ l dengan kemurnian DNA sebesar 2,17 pada rasio $A_{260/280}$. Uji kuantitatif ekstrak DNA *Vibrio parahaemolyticus* dari isolat BBPBAP Jepara menunjukkan konsentrasi DNA sebesar 88,3 ng/ μ l dengan kemurnian DNA sebesar 2,11 pada rasio $A_{260/280}$. Uji kuantitatif ekstrak DNA *Bacillus pumilus* (kontrol negatif) menunjukkan konsentrasi DNA sebesar 70,1 ng/ μ l dengan kemurnian DNA sebesar 1,92 pada rasio $A_{260/280}$. Hasil analisis kemurnian dan konsentrasi DNA tersebut menunjukkan bahwa metode isolasi DNA dalam penelitian ini telah dapat mengisolasi DNA dari isolat bakteri *V. parahaemolyticus* dari air tambak udang vanname, isolat *V. parahaemolyticus* dari BBPBAP Jepara, dan isolat *Bacillus pumilus*.



Gambar 4.2 Visualisasi Produk PCR gen *tlh* dalam 1% agarose dengan Kappa Universal Ladder 100bp DNA ladder

Keterangan :

M : Marker

1 : *V. parahaemolyticus* isolat BBPBAP Jepara

2 : *V. parahaemolyticus* isolat air tambak udang vanname

3 : *Bacillus pumilus*

Primer *tlh*-F dan *tlh*-R mengamplifikasi gen *tlh* pada isolat DNA *V. parahaemolyticus* dari air tambak udang vanname dan isolat DNA dari *V.*

parahaemolyticus dari BBPBAB Jepara di segmen pita DNA 113 bp (gambar 4.2). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Vinoj (2014), menunjukkan bahwa produk DNA yang berukuran 113 bp spesifik menunjukkan gen *tlh* pada *V. parahaemolyticus*. Kedua set primer *tlh* menghasilkan produk amplifikasi DNA berupa pita tunggal DNA pada agarose 1% yang sesuai untuk ukuran gen *tlh* pada *V. parahaemolyticus*, sehingga dapat digunakan untuk proses sekuensing. Berdasarkan hasil PCR pada ekstrak DNA *Bacillus pumilus* tidak terdeteksi adanya gen *tlh*. Hal ini menunjukkan bahwa gen *tlh* hanya dimiliki oleh bakteri *V. parahaemolyticus*.

Sekuensing hasil amplifikasi DNA gen *tlh* dari isolat *V. parahaemolyticus* dilakukan untuk memperoleh urutan basa DNA. Data sekuensing yang diperoleh dilakukan penyejajaran dengan menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) pada website *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Penyejajaran isolat *V. parahaemolyticus* hasil produk amplifikasi dengan primer gen *tlh* menunjukkan bahwa gen *tlh* pada isolat *V. parahaemolyticus* memiliki panjang Query sebesar 84 bp. Hasil analisis homologi dengan BLAST menunjukkan bahwa isolat bakteri dari air tambak udang vanname di Kabupaten Rembang teridentifikasi sebagai bakteri *Vibrio parahaemolyticus* berdasarkan gen penyandi *tlh*. *Query cover* yang menunjukkan keselarasan query, menunjukkan nilai tertinggi sebesar 70% pada spesies *Vibrio parahaemolyticus* strain VP1-1997. Tingkat kemiripan tertinggi dimiliki oleh sekuen gen *tlh* pada spesies *V. parahaemolyticus* strain VP1-1997 dengan *max score* dan *total score* yang sama yaitu 104. *E value* $3e-19$ yang diperoleh menunjukkan penyejajaran yang signifikan berdasarkan pencarian sekuen gen *tlh* yang identik dimiliki

Vibrio parahaemolyticus. Sekuen isolat sampel menunjukkan kesesuaian yang meliputi genus sampai ke tingkat spesies *V. parahaemolyticus*. Berdasarkan hasil analisis penyejajaran BLAST diketahui bahwa isolat bakteri dari air tambak udang vanname di Kabupaten Rembang teridentifikasi memiliki tingkat kemiripan 98% dengan sekuen penanda gen *tlh* pada *Vibrio parahaemolyticus*. Gen *tlh* spesifik mengidentifikasi spesies bakteri *V. parahaemolyticus*. Hal ini sesuai dengan pernyataan Bhunia (2008) bahwa gen *tlh* ditemukan di semua genom strain *V. parahaemolyticus* sebagai marker spesifik untuk menentukan spesies *V. parahaemolyticus*. Namun, gen *tlh* tidak dapat menunjukkan fungsi yang signifikan untuk menentukan virulensi *V. parahaemolyticus*.

Hasil PCR gen *tdh* pada isolat *V. parahaemolyticus* dari air tambak udang vanname dan *V. parahaemolyticus* dari BBPBAB Jepara dengan primer *tdh86F* dan *tdh331R* tidak menghasilkan produk DNA. Hal ini menunjukkan hasil TDH negatif dimana gen *tdh* sebagai penyandi *thermostable direct hemolysin* tidak terdeteksi pada isolat *V. parahaemolyticus*. Hal ini sesuai dengan pernyataan Levin (2009) bahwa *V. parahaemolyticus* menghasilkan *thermostable direct hemolysin* yang diregulasi oleh gen *tdh* sebagai salah satu faktor yang menentukan virulensi bakteri pada organisme inang. Hasil identifikasi molekuler dengan amplifikasi gen *tdh* menunjukkan bahwa isolat bakteri *V. parahaemolyticus* dari air tambak udang vanname di Kabupaten Rembang dan isolat BBPBAB Jepara terdeteksi tidak memiliki gen *tdh* yang menyandi *thermostable direct hemolysin* sebagai salah satu faktor virulensi utama pada bakteri.

Uji Konfirmasi Gen *tdh*

Menurut Belkin dan Collwell (2005), aktivitas zona bening yang terbentuk pada media *blood agar* wagatsuma menunjukkan aktivitas -hemolisis yang disebabkan oleh *thermostable direct hemolysin* dari bakteri *V. parahaemolyticus* yang dikenal sebagai Fenomena Kanagawa. Fenomena Kanagawa menjadi indikator untuk uji konfirmasi adanya gen *tdh* dalam penentuan karakteristik virulensi pada bakteri *V. parahaemolyticus*. Isolat *V. parahaemolyticus* dari BBPBAB Jepara dan isolat *V. parahaemolyticus* dari air tambak udang vanname menunjukkan hasil Kanagawa negatif dengan pertumbuhan koloni bakteri berwarna ungu-keabuan dan tidak ada area bening yang terbentuk di sekitar koloni bakteri pada media agar wagatsuma yang menunjukkan. Menurut Buller (2014), Kanagawa negatif ditunjukkan dimana area bening atau transparan tidak terbentuk pada sel darah di sekitar koloni *V. parahaemolyticus* yang tumbuh pada media agar Wagatsuma. Isolat bakteri *Bacillus pumilus* tidak menunjukkan pertumbuhan koloni bakteri pada media agar wagatsuma yang mengandung kadar NaCl yang tinggi. Menurut Vaishnavi (2013), konsentrasi garam yang tinggi serta pH media basa menjadikan media agar Wagatsuma sebagai media selektif yang baik untuk pertumbuhan *Vibrio parahaemolyticus*.

Hasil Kanagawa negatif mengindikasikan bahwa isolat *V. parahaemolyticus* dari BBPBAB Jepara dan isolat *Vibrio parahaemolyticus* dari air tambak udang vanname tidak memiliki gen *tdh* sehingga tidak menunjukkan aktivitas hemolisis pada sel darah di media agar Wagatsuma. Menurut Yanagihara *et al* (2010), agar Wagatsuma mengandung 5% sel darah manusia yang digunakan untuk mengetahui aktivitas -hemolisis pada *V. parahaemolyticus* strain patogen.

Aktivitas -hemolisis pada agar wagatsuma merupakan salah satu faktor virulensi yang dihasilkan oleh *thermostable direct haemolysin* pada *V. parahaemolyticus* strain patogen. Menurut Hester dan Harrison (2011), bakteri *V. parahaemolyticus* yang ditemukan pada lingkungan aquatik umumnya tidak menghasilkan -hemolisis pada media agar wagatsuma. Bakteri *V. parahaemolyticus* yang tidak memiliki *thermostable direct hemolysin*, maka tidak mempunyai faktor untuk meregulasi karakteristik virulensi untuk menyebabkan kolonisasi organisme di lingkungan aquatik.

Kemungkinan bakteri *V. parahaemolyticus* yang memiliki *thermostable direct hemolysin* ditemukan pada lingkungan aquatik diketahui masih berada pada level yang rendah. Hal ini sesuai dengan pernyataan Raghunanth *et al* (2015) yang menunjukkan bahwa *V. parahaemolyticus* strain patogen memiliki kesensitifan tinggi terhadap kondisi level oksigen rendah dan level komponen organik yang tinggi pada lingkungan aquatik. Hal ini menyebabkan terbatasnya kemampuan *V. parahaemolyticus* strain patogen untuk bertahan hidup di lingkungan dengan faktor eksternal yang tidak terkontrol. Faktor eksternal yang bervariasi pada lingkungan aquatik menjadi penghambat untuk meregulasi faktor virulensi pada bakteri *V. parahaemolyticus* strain patogen. Hal ini menjadi salah satu penyebab *V. parahaemolyticus* dengan *tdh* negatif lebih umum ditemukan di lingkungan aquatik seperti area tambak udang vanname di Kabupaten Rembang. Identifikasi molekuler dan uji konfirmasi gen *tdh* dalam penelitian ini berhasil menunjukkan bahwa isolat bakteri *V. parahaemolyticus* dari air tambak udang vanname di Kabupaten Rembang tidak memiliki faktor untuk meregulasi karakteristik virulensi untuk

memulai kolonisasi pada organisme inang di lingkungan aquatik ini.

Udang vanname merupakan salah satu organisme inang yang rentan terhadap infeksi *V. parahaemolyticus* di lingkungan perairan tambak. Bakteri *V. parahaemolyticus* dapat menginfeksi udang vanname melalui luka pada eksoskeleton dan pada saat terjadinya siklus pengelupasan eksoskeleton yang menyebabkan udang vanname rentan terhadap infeksi patogen. Menurut Selvin *et al* (2015), *V. parahaemolyticus* menjadi patogen oportunistik pada inang udang vanname karena bakteri tidak dapat beradaptasi dengan faktor eksternal lingkungan yang memberikan tekanan terhadap pertumbuhan bakteri. Oleh karena itu *V. parahaemolyticus* akan menjadi patogen oportunistik pada udang vanname ketika menemukan kondisi yang optimal pada inang untuk mendapatkan nutrisi yang digunakan untuk metabolisme pertumbuhan bakteri.

Batas maksimum cemaran bakteri *V. parahaemolyticus* pada udang vanname yaitu negatif per 25 gram (ISO: SNI 7388-2009). Apabila *V. parahaemolyticus* pada udang vanname ditemukan melebihi batas maksimum cemaran mikroba dalam pangan, maka udang vanname tidak layak untuk dikonsumsi karena dapat menimbulkan risiko menjadi patogen oportunistik pada inang manusia. Menurut Letchumanan *et al* (2014), konsumsi udang vanname mentah atau dimasak tidak terlalu matang dapat menjadi penyebab utama infeksi *V. parahaemolyticus* pada inang manusia. Uji konfirmasi gen *tdh* dengan hasil *tdh* negatif menunjukkan kualitas air yang optimal, dimana gen *tdh* yang menyandi faktor virulensi *thermostable direct hemolysin* tidak ditemukan pada bakteri *V. parahaemolyticus* dari air tambak udang vanname di Kabupaten Rembang. Hal ini menunjukkan bahwa *Vibrio parahaemolyticus* yang merupakan

inhabitan alami di lingkungan tambak udang vanname di Kabupaten Rembang tidak memiliki faktor virulensi untuk memulai kolonisasi dan menyebabkan infeksi pada organisme inang.

SIMPULAN

Isolasi bakteri dari air tambak udang vanname pada media *Compact Dry VP* menunjukkan pertumbuhan koloni bakteri berwarna hijau-kebiruan yang teridentifikasi spesifik sebagai bakteri *Vibrio parahaemolyticus*. Koloni bakteri *V. parahaemolyticus* pada media *thiosulfate citrate bile salts sucrose* (TCBS) tumbuh menjadi koloni bakteri berukuran kecil berwarna hijau-kebiruan. Hasil analisis molekuler berdasarkan penyandi gen *tlh* diketahui bahwa isolat bakteri dari air tambak udang vanname di Kabupaten Rembang teridentifikasi sebagai bakteri spesies *Vibrio parahaemolyticus*. Isolat bakteri *V. parahaemolyticus* dari air tambak udang vanname terdeteksi *tdh* negatif, yang mengindikasikan bahwa bakteri tidak memiliki gen *tdh* untuk menyandi *thermostable direct hemolysin* yang menentukan faktor virulensi. Uji konfirmasi gen *tdh* pada isolat bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dengan media agar wagatsuma menunjukkan hasil Kanagawa negatif yang mengindikasikan bahwa bakteri tidak menghasilkan *thermostable direct hemolysin* sebagai faktor virulensi untuk memulai kolonisasi pada organisme inang di lingkungan akuatik ini.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Leibniz Center for Tropical Marine Ecology (ZMT) Bremen, Jerman yang telah memberikan dukungan material yang dibutuhkan dalam penelitian sehingga penelitian ini dapat diselesaikan dengan hasil yang optimal.

Terima kasih juga penulis ucapan kepada Dr.rer.nat. Anto Budiharjo, M. Biotech. dan Dr. Siti Nur Jannah, M.Si. selaku dosen pembimbing yang telah memberi bimbingan serta nasihat dalam melaksanakan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Alam, M.H., Tomochika, K., Miyoshi, S., dan S. Shinoda. 2002. Environmental Investigation of Potentially Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Seto-Inland Sea, Japan. *FEMS Microbiology Letters*. 208: 83-87
- Bej, A.K., Patterson, D.P., Brasher, C.W., Vickery, M.C.L., Jones, D.D., dan C.A. Kaysner. 1999. Detection of Total and Hemolysin-Producing *Vibrio parahaemolyticus* in Shellfish Using Multiplex PCR Amplification of *tl*, *tdh*, and *trh*. *Journal of Microbial Methods*. 36 : 215 – 225
- Belkin, S., dan R. R. Colwell. 2005. *Ocean and Health: Pathogens in the Marine Environment*. New York: Springer
- Bhunia, A.K. 2008. *Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis*. West Lafayette: Springer
- Buller, N. 2014. *Bacteria and Fungi from Fish and Other Aquatic Animals: A Practical Identification Manual. Edisi Kedua*. Boston: CABI
- DePaola, A., Nordstrom, J.L., Bowers, J.C., Wells, J.G., dan D.W. Cook. 2003. Seasonal Abundance of Total and

- Pathogenic *V. parahaemolyticus* in Alabama Oysters. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*. 69 (3): 1521 – 1526
- Faruque, S.M. 2012. *Foodborne and Waterborne Bacterial Pathogens Epidemiology, Evolution and Molecular Biology*. Dhaka: Caister Academic Press
- Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezhuk, Y., McGinnis, S., dan T.L. Madden. 2008. NCBI BLAST: A Better Web Interface. *Nucleic Acid Research*. 36(2): 5 - 9
- Hester, R.E., dan R.M. Harrison. 2011. *Marine Pollution and Human Health*. Cambridge: RSC Publishing
- Kodaka, H., Teramura, H., Mizuochi, S., Saito, M., dan H. Matsuoka. 2009. Evaluation of the Compact Dry VP Method for Screening Raw Seafood for Total *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Food Protection*. 72 (1): 169 – 173
- Labbe, R.G., dan S. Garcia. 2013. *Guide to Foodborne Pathogens*. Second Edition. Hoboken: Wiley-Blackwell
- Letchumanan, V., Chan, K., dan L. Lee. 2014. *Vibrio parahaemolyticus*: A Review on the Pathogenesis, Prevalence, and Advance Molecular Identification Techniques. *Frontiers in Microbiology*. 5: 1-13
- Levin, R.E. 2009. *Rapid Detection and Characterization of Foodborne Pathogens by Molecular Techniques*. Boca Raton: CRC Press
- Motarjemi, Y., Moy, G., dan E. Todd. 2014. *Encyclopedia of Food Safety*. Volume 1. London: Elsevier
- Nelapati, S., Nelapati, K., dan B. K. Chinnam. 2011. *Vibrio parahaemolyticus*: An Emerging Foodborn Pathogen. *Veterinary World*. 5 (1): 48 – 62
- Nordstrom, J.L., Vickery, M.C.L., Blackstone, G.M., Murray, S.L., dan A. DePaola. 2007. Development of a Multiplex Real-Time PCR Assay with An Internal Amplification Control for the Detection of Total and Pathogenic *V. parahaemolyticus* Bacteria in Oysters. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*. 73 (18): 5840 – 5847
- Raghunath, P., 2015. Roles of Thermostable Direct Hemolysin (TDH) and TDH-related Hemolysin (TRH) in *Vibrio parahaemolyticus*. *Frontiers in Microbiology*. 5: 8-11
- Riemann, H.P., dan D.O. Cliver. 2006. *Foodborne Infection and Intoxicants*. Third Edition. San Diego: Elsevier
- Selvin, J., Ramu, M., Ninawe, A.S., dan S. Kiran. 2015. Control of Pathogenic Vibrios in Shrimp Aquaculture Using Antiseptics from Marine Natural Products. *Nutricion Acuicola*. 102-141

- Soto-Rodriguez, S.A., Gomez-Gil, B., Lozano-Olvera, R., Betancourt-Lozano, M. dan S. Morales-Covarrubias. 2015. Field and Experimental Evidence of *V. parahaemolyticus* as the Causative Agent of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease of Cultures Shrimp (*L. vannamei*) in Northwestern Mexico. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*. 81 (5): 1689 – 1699
- Teramura, H., Mizuochi, S., dan H. Kodaka. 2011. Evaluation of a New Chromogenic Selective Medium for Isolation and Enumeration of *Vibrio parahaemolyticus*. *African Journal of Microbiology Research*. 5 (21): 3432 – 3426
- Vaishnavi, C. 2013. *Infections of The Gastrointestinal System*. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers
- Vinoj, G., Vaseeharam, B., dan G. Brennan. 2014. Green Fluorescent Protein Visualization of *Vibrio parahaemolyticus* Infections in Indian White Shrimp *Fenneropenaeus indicus* (H Milne Edwards). *Aquaculture Research*. 45: 1989-1999
- West, C.K., Klein, S.L., dan Charles R.L. 2013. High Frequency of Virulence Factor Genes *tdh*, *trh*, and *tlh* in *Vibrio parahaemolyticus* Strains Isolated from a Pristine Estuary. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*. 70 (7): 2247 – 2252
- Xie, Z.Y., Hu, C.Q., Chen, C., Zhang, L.P., dan C.H. Ren. 2005. Investigation of Seven *Vibrio* Virulence Genes Among *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* Strain from The Coastal Mariculture Systems in Guangdong, China. *Letters in Applied Microbiology*. 41: 202-207
- Yanagihara, I., Nakahira, K., Yamane, T., Kaieda, S., Mayanagi, K., Hamada, D., Fukui, T., Ohnishi, K., Shimizu, K., T., Sato, M., Ikegami, T., Ikeguchi, M., Honda, T., dan H. Hashimoto. 2010. Structure and Functional Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* Thermostable Direct Hemolysin. *The Journal of Biological Chemistry*. 285 (21): 16267 – 16274