

ISOLASI, ENUMERASI DAN DETEKSI MOLEKULER GEN *toxR* PADA BAKTERI *Vibrio parahaemolyticus* DARI TAMBAK UDANG VANNAMAE DI REMBANG

Tu'thi 'Alawiyah¹, Anto Budiharjo¹, Agung Suprihadi¹

¹Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro
Semarang 50275 Telepon (024) 7474754; Fax. (024) 76480690
tuthialawiyah410@gmail.com
anto.budiharjo@fulbrightmail.org
agungsuprihadi61@gmail.com

ABSTRACT

The presence of opportunistic pathogen bacteria in shrimp pond water is caused by 3 factor. There is environmental factor, shrimp condition and the existence of bacteria. Vibrosis disease in shrimp is harmful to farmers because it makes reducing result and caused disease in humans. Bacteria often found among types of Vibrio. The toxR gene is known as the transmembrane regulator gene that control the expression of toxin gene. This study aims to determine the existence of toxR gene in Vibrio parahaemolyticus in pond water samples by PCR method. Bacterial isolation was performed using selective media CDVP Nissui. Enumeration of bacteria by TPC method to determine the number of suspected V. parahaemolyticus on CDVP. Extraction of bacterial DNA using QIAamp® DNA Mini Kit. A good qualitative result of the DNA extraction then amplified by toxR primer. Sequencing process sent to PT. Genetica Science. V. parahaemolyticus inoculated on CDVP media showed blue-green color because it can not ferment sucrose. Dry media CDVP Nissui can be used as a medium in the enumeration of Vibrio parahaemolyticus ($1,6 \times 10^2$ CFU/ml in water sample) because it can be distinguished by the type of bacteria colony color that appears. The PCR protocol used was annealing at 62°C with a cycle 30 times. Electrophoresis results showed that bacterial samples from pond water positively containing toxR gene with length 368 bp. From sequence base data of nucleotides, the sample has 99% equation with V. parahaemolyticus in the NCBI bank gene. Samples of V. parahaemolyticus bacteria in shrimp pond water in Rembang are known contain the toxR gene.

Keyword : V. parahaemolyticus, toxR gene, enumeration, TCBS, CDVP

ABSTRAK

Keberadaan bakteri patogen oportunistik di air tambak udang disebabkan karena adanya tiga faktor penyebab diantaranya faktor lingkungan, kondisi udang dan keberadaan bakteri patogen. Bakteri yang sering ditemukan antara lain jenis *Vibrio*. Gen *toxR* diketahui sebagai gen regulator transmembran yang mengontrol ekspresi gen lain seperti gen toksin. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi adanya gen *toxR* bakteri *V. parahaemolyticus* pada sampel air tambak dengan cara isolasi, enumerasi dan deteksi molekuler gen *toxR* dengan metode PCR. Isolasi bakteri dilakukan menggunakan media selektif *Vibrio* CDVP. Enumerasi bakteri dengan metode TPC untuk mengetahui jumlah bakteri yang diduga *V. parahaemolyticus* pada media selektif CDVP. Ekstraksi DNA bakteri menggunakan QIAamp® DNA Mini Kit, hasil kualitatif yang baik dari proses ekstraksi DNA kemudian dilakukan amplifikasi dengan primer *toxR*. Proses sekuensing dikirim ke PT. Genetika Science. *V. parahaemolyticus* yang diinokulasikan pada media CDVP menunjukkan warna hijau kebiruan karena tidak dapat memfermentasi sukrosa. Kerapatan bakteri *V. parahaemolyticus* pada media CDVP adalah 6×10^2 CFU/ml air tambak sehingga media kering CDVP Nissui dapat dijadikan sebagai media dalam proses enumerasi bakteri *Vibrio* karena dapat dibedakan jenis bakterinya berdasarkan warna koloni yang muncul. Protokol PCR yang digunakan adalah annealing pada suhu 62°C dengan siklus sebanyak 30 kali. Hasil elektroforesis menunjukkan sampel bakteri dari air tambak positif mengandung gen *toxR* dengan panjang 368 bp. Dari data urutan basa nukleotida setelah proses sekuensing, sampel memiliki persamaan 99% dengan *V. parahaemolyticus* yang ada di gen bank NCBI. Sampel bakteri *V. parahaemolyticus* pada air tambak udang di Rembang diketahui mengandung gen *toxR*.

Kata Kunci : *V. parahaemolyticus*, gen *toxR*, enumerasi, TCBS

PENDAHULUAN

Udang merupakan salah satu komoditas ekspor yang memiliki nilai jual yang tinggi sehingga dijadikan produk ekspor non-migas dan memberi pemasukan cukup besar bagi devisa negara (Felix dkk, 2011). Pada awalnya jenis udang yang dibudidayakan di air payau adalah udang windu, namun setelah mewabahnya penyakit *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) atau bercak putih dan bakteri, mengakibatkan menurunnya usaha udang windu. Pemerintah mengintroduksi udang *Vannamei* (*Litopenaeus vannamei*) pada tahun 2001 untuk membangkitkan kembali usaha tambak udang di Indonesia dan dalam rangka diversifikasi komoditas perikanan (Nasi dkk, 2009).

Berbagai kegagalan panen yang terjadi di tambak udang di Indonesia menjadi fenomena yang merugikan petani tambak. Kegagalan panen udang bisa disebabkan karena menurunnya produksi udang akibat pertumbuhan udang yang terhambat. Kematian masal udang akibat serangan penyakit menyebabkan petani melakukan pemanenan udang secara dini. Bakteri yang sering menyerang adalah jenis *Vibrio* yang dapat mengakibatkan kematian udang dalam waktu yang cepat dan dalam jumlah yang besar.

Udang yang terserang *Vibrio* umumnya ditandai dengan gejala klinis, udang terlihat lemah, berwarna merah gelap atau pucat, antena dan kaki renang berwarna

merah. Bakteri ini dapat menginfeksi dan menyebabkan penyakit apabila udang dalam kondisi lemah dan kondisi lingkungan yang ekstrim (Lopillo, 2000). Menurut Suwono dan Markus (2010), rendahnya kualitas air pada media pemeliharaan dapat mengakibatkan rendahnya tingkat pertumbuhan, sintasan dan frekuensi ganti kulit, serta peningkatan bakteri yang merugikan. Beberapa peubah kualitas air meliputi suhu, salinitas, pH, dan oksigen terlarut.

Infeksi yang disebabkan oleh strain virulen dari *V. parahaemolyticus* sering dilaporkan terjadi di beberapa negara Asia bagian selatan. Hal ini disebabkan karena adanya kontaminasi makanan laut oleh strain virulen. Bakteri jenis ini ditemukan pada makanan laut seperti ikan, udang, cumi-cumi, kepiting dan kerang-kerangan. Infeksi *V. parahaemolyticus* disebabkan karena konsumsi makanan laut mentah atau setengah matang yang mengandung strain virulen *V. parahaemolyticus* (Nakaguchi, 2013).

Bakteri *V. parahaemolyticus* memiliki gen regulator yang mengatur pengeluaran faktor virulensinya sehingga menyebabkan penyakit. Gen regulator tersebut adalah gen *toxR*. Gen *toxR* ditemukan pada bakteri jenis *Vibrio* patogen. Pada penelitian ini dilakukan deteksi gen *toxR* pada bakteri dari sampel air tambak dengan menggunakan metode PCR.

Bahan dan Metode

Pengambilan sampel air tambak udang dilakukan di tambak udang Kabupaten Rembang pada bulan September-Desember 2016, sedangkan analisis air tambak dilakukan di Laboratorium Terpadu, Universitas Diponegoro, Semarang.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu sampel air tambak udang, kultur isolat bakteri *V. parahaemolyticus* dari BBPBAP Jepara, Media TCBS, Compactdry VP Nissui, set pewarnaan Gram, QIAamp® DNA Mini Kit, ddH₂O, buffer PCR, primer *toxR forward* dan *reverse*, agarosa, *gelred*, *buffer*

TAE (Tris Asetat EDTA), marker DNA ladder Universal.

Isolasi dan Enumerasi Bakteri

Isolasi bakteri yang berasal dari sampel air tambak udang di Rembang dilakukan menggunakan teknik pengenceran bertingkat. 100 µl sampel air pada pengenceran 10^{-2} dimasukkan ke bagian tengah media CDVP, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Bakteri diduga *V. parahaemolyticus* yang tumbuh dihitung menggunakan teknik *Total Plate Count* (TPC) dengan memperhatikan warna koloni. Perhitungan TPC dinyatakan sebagai jumlah koloni bakteri yang dihitung dikalikan faktor pengencer per ml. Setiap koloni yang tumbuh direinokulasi pada media TCBS. Pengamatan morfologi bakteri dilakukan dengan teknik pewarnaan Gram dan diamati pada mikroskop dengan perbesaran 1000X.

Ekstraksi DNA Bakteri

Ekstraksi DNA total dilakukan dengan menggunakan QIAamp® DNA Mini Kit. Koloni tunggal sampel bakteri sampel diletakkan di suhu ruang. 500 µl Buffer AL dimasukkan ke dalam tabung effendorf yang berisi isolat bakteri kemudian di *vortex* selama 30 detik. Selanjutnya sejumlah sampel diinversi sebanyak 5 kali kemudian masing-masing sampel di *vortex* kembali selama 30 detik. Sampel diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang. 200 µl ethanol dingin dimasukkan ke dalam sampel kemudian di *vortex* selama 30 detik. Transfer larutan (500-600 µl) ke dalam tube penampung DNA (tube dengan filter). Sentrifuge selama 30 menit pada kecepatan 8000 rpm. Tube penampung DNA beserta supernatan dibuang selanjutnya dimasukkan ke tube

penampung DNA baru. 500µl buffer AW1 ditambahkan, sentrifuge selama 1 menit dengan kecepatan 8000 rpm. Tube penampung DNA diganti baru. 500 µl buffer AW2 ditambahkan, disentrifuge selama 3 menit dengan kecepatan 14000 rpm. Supernatan yang tertampung dibuang, kemudian disentrifuge kembali selama 1 menit dengan kecepatan 14000 rpm. Tube penampung DNA dibuang dan tube filter dipindahkan ke tabung effendorf dengan penutup. 100 µl buffer AE ditambahkan, sentrifuge selama 1 menit dengan kecepatan 8000 rpm.

Primer *toxR* digunakan dalam penelitian ini (R: 5'-GTCTTCTGACGCAATCGTTG – 3' dan F: 5' – ATACGAGTGGTTGCTGTCATG – 3') berkorelasi dengan region *toxR* pada *V. parahaemolyticus* (Kim *et al.*, 1999). Primer diperoleh dari PT. Genetika Science Indonesia.

Protokol PCR

Teknik PCR dilakukan menggunakan tube mikrofuge 0,5 ml. Total volume campuran reaksi adalah 25 µl yang mengandung 5 µl Buffer PCR; 0,5 µl Mytaq polymerase ; 12,5 µl ddH₂O ; 1 µl Forward primer; 1 µl Revers primer; 5 µl DNA template. Amplifikasi dilakukan dengan kondisi predenaturasi pada suhu 96°C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, annealing pada suhu 62°C selama 1,5 menit dan ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit dengan final ekstensi pada suhu 72°C selama 7 menit pada akhir 30 siklus. Hasil amplifikasi akan dibandingkan dengan kontrol positif dan negatif.

Elektroforesis Gel Agarosa

Produk PCR dirunning dalam 1% gel agarosa dengan penambahan *Gelred*. 4 µl produk PCR dimasukkan ke dalam sumuran agarosa. Elektroforesis dilakukan selama 40 menit dengan tegangan 100 volt. Pengamatan migrasi DNA dilakukan menggunakan lampu UV transluminator.

Analisa Sekuen

Urutan sekuen fragmen gen *toxR* yang diperoleh selanjutnya di sekuen di First Base Laboratories Sdn Bhd, Syah Alam, Selangor, Malaysia untuk mengetahui urutan basa DNA-nya. Hasil sekuen kemudian diujarkan dengan data GenBank menggunakan program BLAST pada website www.ncbi.nlm.nih.gov untuk mengetahui kemiripannya dengan gen yang sudah dilaporkan. Selanjutnya dibuat pohon filogenik untuk mengetahui kekerabatannya dengan bakteri lain.

Hasil dan Pembahasan

Hasil isolasi bakteri pada sampel air tambak udang menunjukkan adanya pertumbuhan *V. parahaemolyticus*. Pada media CDVP tumbuh koloni bakteri berwarna hijau, biru, putih dan ungu. Selanjutnya dilakukan reinokulasi bakteri yang diduga bakteri *V. parahaemolyticus* dengan mengambil koloni berwarna hijau kebiruan ke dalam media pengayaan TCBS. *V. parahaemolyticus* dapat membentuk koloni berwarna hijau kebiruan pada pusat koloni pada media TCBS dan CDVP. *V. parahaemolyticus* berwarna hijau atau biru kehijauan pada agar TCBS dan CDVP karena tidak dapat memfermentasi sukrosa (Zulkifli dkk., 2009; Kodaka *et al.*, 2009).

Media TCBS dan CDVP merupakan media selektif untuk pertumbuhan bakteri

Vibrio pada umumnya. Penentuan jenis *Vibrio* pada media tersebut dilakukan dengan mengamati spesifik warna koloni yang tumbuh.

Medium CDVP mengandung 2% NaCl karena bakteri *Vibrio* bersifat halofilik yaitu bakteri yang tumbuh optimum dalam kondisi garam yang tinggi (United State of America Food and Drug Administration, 2001); bile salt dan antibiotik sebagai substansi penghambat Enterobakteria dan bakteri Gram positif, dan dua substrat β-galaktosidase dan β-glukosidase yang dapat membedakan *V. parahaemolyticus* dengan bakteri lain (Kodaka *et al.*, 2009). Media ini mengandung agen gelling untuk menyaring sejumlah bakteri *Vibrio* dan membuat sampel dapat berdifusi secara otomatis (Mizuochi, 2000). TCBS mengandung Oxbile dan sodium thiosulphate untuk menghambat bakteri Gram positif dan enterobakteria sedangkan gula sukrosa sebagai penanda ada tidaknya bakteri yang memiliki kemampuan untuk memfermentasi sukrosa (Zulkifli dkk., 2009).

Tabel 1. Total Plate Count (TPC) Bakteri *Vibrio parahaemolyticus*

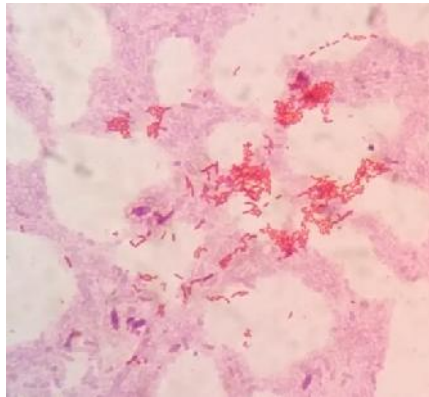
Media	Warna Koloni	Sampel Tt ₁	Sampel Tt ₅
		CFU/ml	CFU/ml
CDVP	Hijau	6 x 10 ²	1,3 x 10 ³

*CFU = Colony Forming Unit

Tabel 1 menunjukkan hasil perhitungan TPC bakteri terduga *V. parahaemolyticus* yang telah dilakukan rata-rata. Sampel Tt₅ menunjukkan kerapatan bakteri *V. parahaemolyticus* lebih banyak dibandingkan sampel Tt₁ pada media CDVP. Bakteri *V. parahaemolyticus* mudah diidentifikasi menggunakan media CDVP karena visualisasinya yang jelas dan

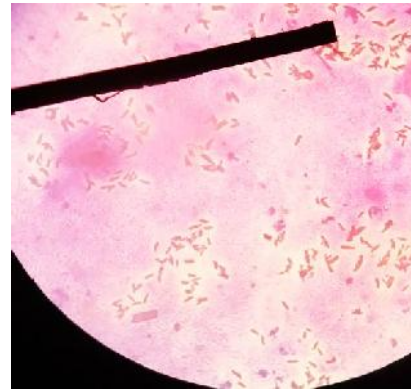
dapat dibedakan dengan bakteri *Vibrio* jenis lain.

Hasil pewarnaan Gram dan pengamatan morfologi menggunakan mikroskop



A

menunjukkan bahwa *V. parahaemolyticus* memiliki sel-sel berwarna merah muda yang merupakan ciri bakteri Gram negatif, berbentuk batang dan membentuk sel tunggal.



B

Gambar 1. Hasil Pewarnaan Gram Bakteri *V. parahaemolyticus* T₁₈ (1.a) dan Bakteri *V. parahaemolyticus* dari BBPBAP Jepara sebagai Kontrol Positif (1.b).

Gen *toxR* atau toxin Regulator pertama kali ditemukan pada bakteri *Vibrio cholera* tetapi kemudian ditemukan juga pada jenis *V. parahaemolyticus* dan *Vibrio* jenis lain dengan susunan basa nukleotida dan ukuran fragmen yang berbeda. Gen *ToxR* ditemukan pada spesies *Vibrio* lain karena perannya dalam memodulasi sistem pertahanan terhadap garam empedu saat berada di dalam usus sebagai bakteri patogen penyebab penyakit diare. (Provenzano, 2000). Gen ini mengaktifkan gen-gen lainnya untuk menghasilkan produk toksin berupa hemolysin seperti *Thermostable Direct Hemolysin* (TDH) dan *TDH-Relates Hemolysin* (TRH) pada *Vibrio parahaemolyticus* (Marlina, 2015).

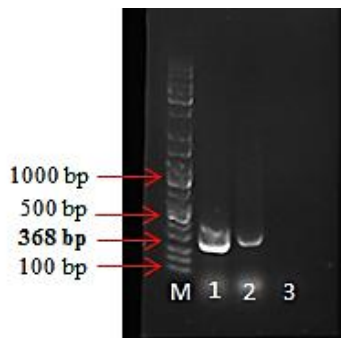
Kombinasi primer dan suhu annealing yang digunakan saat amplifikasi sangat menentukan produk PCR. Kondisi PCR ini telah dilakukan tahap optimasi. Protokol PCR yang dilakukan dalam 30 siklus dan suhu annealing menjadi 62°C menunjukkan produk PCR dengan ukuran yang sesuai walaupun tipis.

Elektroforesis diawali dengan pembuatan gel agarose 1% dengan mencampurkan 1 g agarose dengan 100 ml

larutan TAE kemudian di homogenkan menggunakan microwave lalu ditambahkan GelRed™ 1 µl sambil dihomogenkan kemudian dicetak pada chamber. Marker yang digunakan adalah KAPPA universal ladder. DNA template dan marker dengan perbandingan 4:2 dimasukkan ke dalam sumuran agarose. Marker diletakkan di sisi paling kiri sebagai pembanding ukuran DNA. Proses elektroforesis dilakukan selama 40 menit dengan tegangan 100 V. Visualisasi hasil elektroforesis dilakukan dengan menggunakan *geldoc*. GelRed adalah dye asam nukleat fluoresen yang sensitif, stabil dan lebih aman untuk menggantikan ethidium bromide (EtBr) yang dikenal toksik.

Hasil agarose yang telah divisualisasikan menggunakan *geldoc* menunjukkan adanya fragmen DNA dengan panjang 368 bp dan positif mengandung gen *toxR*. Hal ini terlihat dari adanya ukuran hasil amplifikasi DNA sampel yang sama dengan kontrol positif *V. parahaemolyticus* yang mengandung gen penyandi *toxR* pada ukuran amplicon 368 bp. Kontrol negatif tidak membentuk garis fragmen. Menurut Kim *et al* (1999)

primer *toxR* mampu mengamplifikasi fragmen spesifik dengan ukuran 368 bp.

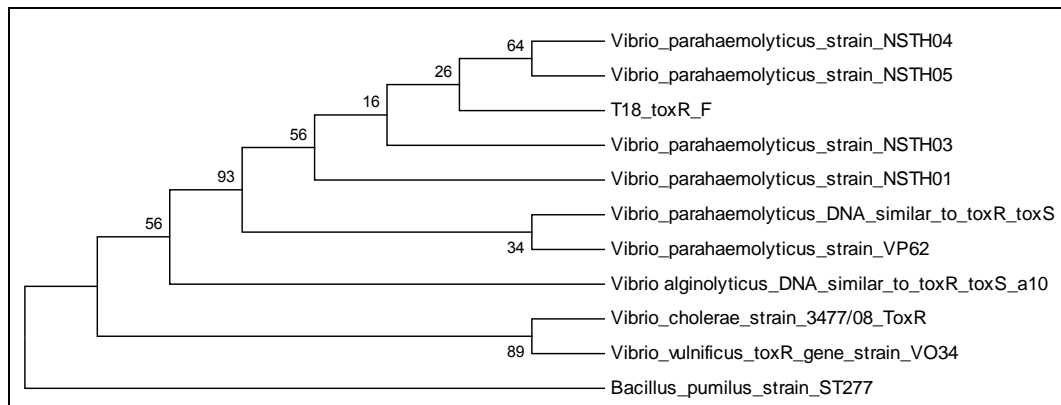


Gambar 2. Elektroforegram Hasil PCR gen *ToxR*. DNA Marker 100 bp (M), Kontrol positif *V. parahaemolyticus* (1), Sampel T18 (2), Kontrol negatif ddH₂O (3)

Sekuensing DNA adalah teknik untuk menentukan urutan basa nukleotida dari urutan suatu DNA seperti adenin, timin, guanin dan sitosin. Sekuensing DNA dapat dimanfaatkan untuk menentukan identitas maupun fungsi gen atau fragmen DNA lainnya dengan cara membandingkan sekuens-nya dengan

sekuens DNA lain yang sudah diketahui. Urutan basa nukleotida sampel T₁₈ memiliki kemirip 99% dengan beberapa sampel *Vibrio parahaemolyticus* strain NSTH01 dengan Max score dan total score sama yaitu 590. Gen *toxR* diketahui sebagai gen regulator untuk mengaktifkan fungsi gen lain seperti *tlh* dan *tdh* untuk mengetahui tingkat virulensinya. Gen *toxR* dapat digunakan untuk mendeteksi adanya bakteri *V. parahaemolyticus* dengan baik dibuktikan dengan kemampuan identifikasinya sebesar 99%.

Pohon filogenik (*Phylogenetic trees*) membuat percabangan yang menghubungkan titik (nodes), yang merupakan unit taksonomi, seperti spesies atau gen sedangkan akar pohonnya merupakan titik yang bertindak sebagai nenek moyang untuk seluruh organisme yang sedang dianalisis (Felix, 2011). Pohon filogenetik berguna untuk menunjukkan hubungan kekerabatan dari setiap spesies yang dilihat berdasarkan karakteristik molekuler antar spesies maupun antar strain dalam spesies yang sama.



Gambar 3. Pohon Filogenetik berdasarkan gen *toxR* menggunakan analisis *Neighbour-Joining*

Hasil analisis filogenetik dengan menggunakan metode Neighbour Joining (NJ) menunjukkan bahwa isolat T₁₈ dengan *V. parahaemolyticus* strain NSTH04 dan NSTH05 memiliki nilai kekerabatan dalam 26% replikasi bootstrap. Bootstrapping digunakan untuk mengukur seberapa konsisten data yang dibuat dan

stabilitas topologi pohon. Nilai bootstrap yang tinggi (mendekati 100%) artinya data tersebut seragam dan dapat diterima sebagai data satu grup (Holmes, 2003).

Kesimpulan

Bakteri *Vibrio parahaemolyticus* ditemukan pada air tambak udang di wilayah Rembang dengan kerapatan $1,6 \times 10^2$ CFU/ml air tambak. Koloni *V. parahaemolyticus* yang diisolasi pada media TBCS sulit dibedakan secara visual dari beberapa strain *Vibrio* yang lain sehingga media CDVP lebih baik untuk dijadikan sebagai media pertumbuhan bakteri *Vibrio* dalam proses identifikasi serta enumerasi bakteri *Vibrio*. Isolat sampel T₁₈ diketahui sebagai bakteri *Vibrio parahaemolyticus* setelah dideteksi menggunakan primer *toxR*.

Referensi

- Felix Feliatra, Titania T Nugroho, Sila Silalahi dan Yuslina Octavia. 2011. Skrining Bakteri *Vibrio sp* Asli Indonesia Sebagai Penyebab Penyakit Udang Berbasis Teknik 16S Ribosomal DNA. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis* 2(3): 85-99.
- Holmes, Susan. 2003. Bootstrapping Phylogenetic Trees: Theory And Methods. *Statistical Science* Vol. 18 No.2, 241-255.
- Kim, Y.B., Okuda, J., Matsumoto, C., Takahashi, N., Hashimoto, S. and Nishibuchi, M. 1999. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* Strains at The Species Level by PCR Targeted to The *toxR* Gene. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 1173-1177.
- Kodaka Hidemasa, *et al.* 2009. Evaluation of the Compact Dry VP Method for Screening Raw Seafood for Total *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Food Protection* (1)72 :169-173.
- Lopillo, R. 2000. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Heterotropik pada Tambak yang Antagonis Terhadap *Vibrio harveyi* dan *Vibrio parahaemolyticus*. *Skripsi*, Faperikan Unri. Pekanbaru, 27 hal.
- Marlina dan Lola Azyenela. 2015. Deteksi Gen Virulen Bakteri *Vibrio parahaemolyticus* Dari Sampel Pensi (*Corbicula moltkiana*. Prime) Dengan Metoda Polymerase Chain Reaction (PCR). *Jurnal Scientia* 5(1) : 42-46.
- Mizuochi Shingo and Hidemasa Kodaka. 2000. Evaluation of Dry Sheet Medium Culture Plate (Compactdry TC) Method for Determining Numbers of Bacteria in Food Samples. *Journal of Food Protection* 5(63) : 665-667.
- Nakaguchi, Yoshitsugu. 2013. Contamination by *Vibrio parahaemolyticus* and Its Virulent Strains Seafood Marketed in Thailand, Vietnam, Malaysia, and Indonesia. *Tropical Medicine and Health* 3 (41): 95-102.
- Nasi, Lina., Slamet Budi Prayitno dan Sarjito. 2009. Kajian Bakteri Penyebab *Vibriosis* pada Udang Secara Biomolekuler. *Artikel Manajemen Sumberdaya Pantai Universitas Diponegoro*.
- Provenzano, et al. 2000. The Virulence Regulatory Protein *ToxR* Mediates Enhanced Bile Resistance in *Vibrio cholerae* and Other Pathogenic *Vibrio* Species. *Infection And Immunity* Vol. 68, 3 : 1491-1497.
- Zulkifli Y, Alitheen, N.B., Son, R., Yeap, S. K., Lesley, M. B. and Raha, A. R. 2009. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* Isolates by PCR Targeted to The *toxR* Gene and Detection of Virulence Genes. *International Food Research Journal* 16: 289-296.

