

Deteksi Adanya Gen *toxR*, *tdh*, *trh* *Vibrio parahaemolyticus* pada Sampel *Batissa violacea* L dan *Faunus ater* Linn

Ertati Suarni

Dosen Kopertis Wilayah II Dpk UKB Palembang

Abstrak

Vibrio parahaemolyticus bakteri halofilik yang habitat alamnya di muara dan perairan laut pesisir. Adanya gen *tdh* dan *trh* digunakan untuk menentukan patogenisitas strain *V. parahaemolyticus*. Bakteri ini memproduksi toksin hemolisin termostabil ekstraselular, *Thermostable direct hemolysin* (TDH) dan *Thermostable direct hemolysin-related hemolysin* (TRH) yang masing-masing dikode gen virulensi *tdh* dan *trh*. Makanan yang terkontaminasi *V. parahaemolyticus* dapat menimbulkan penyakit gastroenteritis. Tujuan penelitian untuk investigasi kontaminasi makanan, penyebaran dan sebagai masukan data epidemiologi infeksi *Vibrio parahaemolyticus*. Sampel diambil dari sampel mentah kerang air tawar *Batissa violacea* L (Bv_A) dan *Faunus ater* Linn (Fa_A) dari Kota Padang dan Pasaman Sumatera Barat. Isolasi dan deteksi *Vibrio parahaemolyticus* telah dilakukan dengan metode PCR-spesifik. Isolasi bakteri menggunakan media SPB dan CHROMagarVibrio. Deteksi gen *toxR* menggunakan primer set *ToxR4/ToxR7*, *tdh* dengan primer set (*tdh-D3=VPD2*)/(*tdh-D5=VPD1*) dan *trh* menggunakan primer (*trh-R2*)/(*trh-R6*). Hasil penelitian menunjukkan terjadi kontaminasi bakteri halofilik *V. parahaemolyticus* pada sampel kerang air tawar yang hidup pada sungai bermuara ke laut. Jumlah strain isolat $VpBv_A$ berkisar $130 - 5 \times 10^3$ cfu/g dan isolate $VpFa_A$ berkisar $110 - 1 \times 10^4$ cfu/g. Sebanyak 40 isolat uji $VpBv_A$ terdeteksi hanya 1 gen *toxR* (2,5%), dan pada 73 kultur uji $VpFa_A$ terdeteksi 34 gen *toxR* (46,48%). Semua isolat merupakan Kanagawa negatif karena tidak terdeteksi gen *tdh* dan *trh* pembawa sifat patogenik *V. parahaemolyticus*.

Kata Kunci: *Vibrio parahaemolyticus*, gen *toxR*, *tdh*, *trh*, *Batissa violacea* L, *Faunus ater* Linn

Detection of *toxR*, *tdh*, *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* in samples *Batissa violacea* L dan *Faunus ater* Linn

Abstract

Vibrio parahaemolyticus is a halophilic bacterium that occurs naturally in estuarine and coastal marine waters. The presence of the *tdh* and *trh* genes used to determine the pathogenicity of *V. parahaemolyticus* strain. These bacteria produce extracellular thermostable hemolysin, are the thermostable direct hemolysin (TDH) and the thermostable direct hemolysin-related hemolysin (TRH), encoded by the *tdh* and *trh* genes, respectively. Food contaminated by *V. parahaemolyticus* can cause seafood-borne gastroenteritis. The aim of this study was to investigations of food contaminants, distribution and as data entry epidemiology of *Vibrio parahaemolyticus* infection. Samples were taken from the raw freshwater mussels *Batissa violacea* L (BV_A) and *Faunus ater* Linn (FA_A) in Padang and Pasaman West Sumatra. Isolation and detection of *Vp* was studied by PCR specific methods. The isolation of bacteria by SPB medium and CHROMagarVibrio. Detection of gene *toxR* using primer sets *ToxR4/ToxR7*, gene *tdh* by primer sets (*TDH-D3 = VPD2*) / (*TDH-D5 = VPD1*) and gene *trh* using primer sets (*trh-R2*)/(*trh-R6*). The results of this study suggest that contamination of halophilic *V. parahaemolyticus* has occurred in samples. The number of isolates strain $VpBV_A$ ranging $130 - 5 \times 10^3$ cfu/g and strain $VpFA_A$ ranging $110 - 1 \times 10^4$ cfu/g. A total of 40 suspected isolate, only one *toxR* positive of culture tested $VpBV_A$ (2,5%), and 73 culture tested $VpFA_A$ were found 34 gen *toxR* (46,48% *toxR* positive). All the isolates were Kanagawa negative, because were not detection *tdh* and *trh* gene encoded patogenicity *V. parahaemolyticus*

Key word : *Vibrio parahaemolyticus*, *toxR* gene, *tdh*, *trh*, *Batissa violacea* L, *Faunus ater* L

Pendahuluan

Halofilik *Vibrio parahaemolyticus* merupakan bakteri yang hidup di laut dan perairan dengan kadar garam tinggi. Makanan yang terkontaminasi *V. parahaemolyticus* penyebab utama *outbreak foodborne disease* gastroenteritis di dunia. Pertama kali *outbreak* terjadi di Osaka Jepang tahun 1950, karena keracunan "shirasu", sejenis makanan laut. Dilaporkan oleh CDC (*the Centers for Disease Control and Prevention*) sejak tahun 1973 sampai 1998 telah terjadi 40 *outbreaks* infeksi *Vibrio parahaemolyticus* di seluruh dunia. *Vibrio parahaemolyticus* strain O3:K6 dilaporkan sebagai pandemik yang dominan dan

emergensi di banyak negara Asia seperti Jepang, India, Thailand, Korea, Laos.^{1,2}

Infeksi *Vibrio parahaemolyticus* menimbulkan penyakit gastroenteritis, suatu diare hebat disertai dengan demam, sakit kepala, mual dan kram perut sampai kematian. Penyakit ini terjadi biasanya karena mengkonsumsi makanan laut mentah atau kurang sempurna memasaknya, yang terkontaminasi *V. parahaemolyticus* (Tada *et al.*, 1992).³ Masa inkubasi gastroenteritis karena infeksi *Vibrio parahaemolyticus* yang dilaporkan untuk keracunan pangan beragam dari 2 jam sampai 4 hari, umumnya 9 – 25 jam. Penyakit berlangsung 4 sampai 10 hari dan dicirikan oleh diare berair, sakit

perut, sakit kepala, muntah, kram perut dan demam. Penyakit gastroenteritis dapat terjadi jika jumlah *V. parahaemolyticus* yang masuk ke tubuh berkisar 10^6 - 10^8 organisme atau diatas 10^5 cfu per gram. Pada kasus yang berat penyakit ini mengakibatkan kematian karena banyak kehilangan cairan tubuh dan kekurangan darah.^{2,4,5}

Patogenitas *V. parahaemolyticus* disebabkan oleh kemampuannya memproduksi protein invasif dan kolonisasi serta produksi enterotoksin homolog dengan patogenitas *Vibrio cholera*. Infeksi terjadi setelah invasi dan produksi toksin hasil ekspresi gen virulensi yang dibawanya. Setelah Invasi dan kolonisasi *V. parahaemolyticus* yang patogen akan mengeluarkan toksin hemolisin termostabil ekstraselular yakni *thermostable direct hemolysin* (TDH) dan toksin *thermostable direct hemolysin-related hemolysin* (TRH). Kedua protein toksin itu merupakan hasil ekspresi gen virulensi *tdh* dan *trh*. Sedangkan protein kolonisasi *Transmembrane regulatory protein* (ToxR) hasil ekspresi gen *toxR*.⁶ Ekspresi gen *tdh* menjadi toksin TDH meningkat dengan adanya asam empedu (*bile acids*) dalam lumen usus. Mekanisme patogen dan virulen *V. parahaemolyticus* sangat berhubungan dengan hadirnya gen *tdh* dan gen *trh* ini, yang memberikan respon terhadap reaksi α -hemolysis.^{4,7}

Virulensi *V. parahaemolyticus* dikelompokkan menjadi dua grup, Kanagawa Phenomena positif (KP+) yang memiliki *tdh* dan atau *trh* dan Kanagawa Phenomena negatif (KP-) bagi bakteri yang

tidak membawa kedua gen. Grup Kanagawa Phenomena positif (KP+) disebabkan oleh adanya produksi protein toksin TDH (*thermostable direct hemolysin*) yang diproduksi dikode oleh gen *tdh*. Virulensi ini dikaitkan dengan kemampuan *V. parahaemolyticus* menghemolisis tipe beta pada agar darah, Wagatsuma agar, suatu media yang menggunakan darah manusia golongan O.³ Gen *tdh* banyak terdeteksi pada strain *V. parahaemolyticus* dari isolat klinis. Hasil penyelidikan dari sampel klinis mencapai 96% dari 2.720 sampel uji merupakan KP+ sementara pada 650 sampel dari lingkungan hanya 1% yang ditemukan *V. parahaemolyticus* patogen. Enterotoksigenik strain virulen pembawa gen *tdh* ditunjukkan pada uji kloning mutan strain KP positif "*tdh-deficient*" yang tidak memberi reaksi hemolisis pada mutan bakteri tanpa gen *tdh*.⁸

Penelitian terhadap penyebaran bakteri halofilik *V. parahaemolyticus* menjadi studi epidemiologi yang luas di dunia. Dalam syarat Standar Nasional Indonesia untuk produk ikan dan makanan laut impor dan ekspor, seperti dinyatakan dalam kode SNI 01-2332.5-2006, harus bebas dari kontaminasi bakteri ini. Uji kontaminan *V. parahaemolyticus* umumnya diisolasi dari sampel makanan berasal dari laut (*seafood*) mentah maupun yang telah diolah, serta sampel makanan berupa kerang (*shellfish*), ikan, udang, cumi-cumi dan sebagainya.

Sampel penelitian ini *Batissa violacea* L (Lokan) dan *Faunus ater* Linn (Langkitang), termasuk kerang air tawar dan

muara sungai yang hidup di permukaan sedimen dasar perairan. Beberapa sifat kerang antara lain peka terhadap beberapa bahan pencemar, mobilitas rendah, mudah ditangkap serta memiliki kelangsungan hidup yang panjang. Sehingga keberadaannya menjadi indikator kondisi ekologi terkini pada suatu kawasan tertentu.⁹ Sementara itu Kerang air tawar lokan dan langitang, salah satu sumber makanan hewani yang bermanfaat, karena mengandung nilai protein dan gizi yang tinggi, sehingga diminati untuk dikonsumsi. Tetapi sesuai dengan lokasi dan tempat hidupnya dan mengingat mekanisme makan kerang-kerangan berupa *filter feeding*, yaitu cara mendapatkan makanan dengan menyaring air dari tempat hidupnya, kerang-kerangan sangat beresiko terkontaminasi bakteri patogen. Hatta *et al.* (2005) menyatakan hasil penelitian di Fiji menunjukkan kandungan bakteriologis kerang *Batissa violacea* L yaitu spesies *E. coli* sebesar 10 persen dan *V. parahaemolyticus* sebesar tujuh persen (7%).¹⁰

Dalam penelitian ini digunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) spesifik untuk mendeteksi gen *toxR*, *tdh* dan *trh* pada isolat *Vibrio parahaemolyticus*. Metode PCR spesifik dapat mengidentifikasi secara tepat dan cepat karena gen target pada *Virio parahaemolyticus* akan dilipatgandakan (amplifikasi DNA) oleh primer spesifik pada helaian tunggal DNA yang terpisah pada suhu denaturasinya. Selanjutnya DNA gen target dengan

kuantitas yang cukup akan terlihat sebagai pita-pita pada elektroforesis.^{11,12}

Penelitian ini bertujuan mengisolasi dan mendeteksi gen *V. parahaemolyticus* yang mengkontaminasi sampel kerang air tawar *Batissa violacea* L, dan *Faunus ater* Linn mentah yang mungkin ada di Kota Padang dan Kabupaten Pasaman Sumatera Barat. Manfaat yang diharapkan sebagai informasi epidemiologi *Vibrio parahaemolyticus*, mencegah dan mengurangi dampak buruk kesehatan akibat makanan terkontaminasi halofilik *Vibrio parahaemolyticus*.

Metode Penelitian

1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan selama enam bulan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Andalas, Laboratorium Bioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Andalas dan Laboratorium Diagnostik Terpadu Rumah Sakit Umum Muhammad Djamil Kota Padang.

2. Alat dan Bahan

Alat-alat terdiri atas: alat-alat gelas seperti gelas ukur, cawan dan sebagainya, autoklaf (Hirayama HsV-110), *laminar air flow* (ESCO®), lampu spiritus, *hot plate*, bunsen gas, batang *spreader*, jarum ose, lidi tusuk-gigi steril, lampu UV, inkubator (Gallenkamp®), *rotary shaker incubator* (Bigger Bill Digital®), *coloni counter* (Stuart scientific®), Mesin PCR (Eppendorf Mastercycler gradient®) dan PCR

(BioRad®), tabung eppendorf, pipet mikro (Eppendorf®), vortex (Mixer®VM-1000), sentrifugator (Eppendorf Minispin®), lemari pendingin, pinset, penangas air, perangkat elektroforesis (Mupid-eX), kertas parafilm, aluminium foil, Gel Documentation System (BioRad®).

Bahan-bahan terdiri atas: Sampel kerang air tawar *Batissa violacea* L (lokan), dan *Faunus ater* Linn (langkitang), mentah diambil daging beserta sebagian cangkangnya, media *Salt Polymixin Broth* (SPB-Nissui®), media *CHROMagar™ Vibrio* (*CHROMagar-Paris-France*®), Luria Burtani (LB) *Broth* Dicfo®, Luria Burtani Agar (LBA), gliserol, aquadest steril, berbagai *primer solution* (Invitrogen®), *Go Taq polimerase* Promega® (5U/1l), 10x *buffer PCR include MgCl₂*, 2,5 mM dNTP solution, agarose (Nacalai tesque®), ethidium bromida, 1x buffer Tris-Boric-EDTA (Nacalai tesque®), 100 bp DNA ladder (Promega®), blue dye solution, bakteri kontrol positif *V. parahaemolyticus* yakni : untuk gen *toxR* dan gen *tdh* digunakan *V. parahaemolyticus* Strain AQ3815 (= stok no 8069) dan Strain No.VP81 (= stok no 8072) dan untuk gen *trh* Vp Strain No. AT4 (= stok 8071), kontrol negatif *V. alginolyticus* 219 (= stok 8073).

3. Prosedur Penelitian

a. Pengambilan Sampel

Sampel adalah *Batissa violacea* L (kerang lokan), dan *Faunus ater* Linn

(kerang langkitang) yang mentah. Sampling dilakukan delapan kali dari tiga pasar di Kota Padang dan Sungai Sumpo Tanjung Alai Kampung Pisang Pasaman Timur, kemudian diidentifikasi di Laboratorium Invertebrata Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas Padang. Sampel dihancurkan daging beserta cangkangnya dalam *stomacher bag* steril pada lumpang steril secara aseptis, selanjutnya perlakuan untuk isolasi bakteri *Vibrio parahaemolyticus*.

b. Sterilisasi alat dan Pembuatan Media

Semua peralatan kerja dan pembuatan media inokulasi dilakukan sterilisasi, kecuali pembuatan media *CHROMagar™ Vibrio*. Sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 lbs selama 15 menit. Jarum ose dan spatel disterilkan dengan cara dibakar di atas lampu spiritus sampai membara setiap kali akan digunakan. Pembuatan media *CHROMagar™ Vibrio* 7,47% dilarutkan dalam 1 liter aquadest steril di dalam erlenmeyer steril, dipanaskan dengan menggunakan stirer hingga terbentuk massa yang homogen, setelah mendidih segera diangkat, dituang pada cawan petri sebanyak 15-20 ml tanpa sterilisasi.

c. Isolasi Bakteri *Vibrio parahaemolyticus*

Sampel yang telah dihancurkan dalam *stomacher bag* steril diambil sebanyak 10 gram kemudian dimasukkan dalam erlenmeyer berisi 100 ml media SPB broth steril, segera ditutup dengan kapas steril,

dihomogenkan dengan menggoyang erlenmeyer 10 menit. Diambil homogenat 0,1 ml, dimasukkan kedalam tabung eppendorf yang telah berisi 0,9 ml media SPB Broth steril untuk pengenceran 10^{-1} selanjutnya diambil 0,1 ml dilakukan sampai 10^{-5} , duplikasi pengenceran tiga kali untuk mengamati angka kuman. Lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 - 24 jam. Setelah diinkubasi, diamati pertumbuhan kuman pada tabung pengenceran dan homogenat-homogenat tadi diinokulasikan dengan cara $100\ \mu\text{l}$ suspensi bakteri dimasukkan dalam media CHROMagar™ Vibrio pada cawan petri, kemudian diratakan dengan spreader atau dapat juga dilakukan dengan metode penggoresan menggunakan ose steril. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Biakan dalam cawan petri akan memberikan warna ungu tunggal yang menandakan adanya bakteri *V. parahaemolyticus*, dihitung koloni bakteri ungu dengan *coloni counter*.

d. Pemurnian dan Peremajaan Kultur

Koloni ungu tunggal pada media CHROMagar™ Vibrio diambil hati-hati dengan ose, dimasukkan pada tabung reaksi yang telah berisi 5 ml LB Broth, lalu diinkubasi dalam *rotary incubator* 37°C kecepatan 120 rpm selama 18 - 24 jam. Biakan diambil 1 ml dimasukkan kedalam tabung eppendorf disentrifus, media dibuang dan diberi media baru LB Broth yang mengandung 15% gliserol dan diinkubasi pada inkubator selama 2 - 3 jam pada suhu 37°C untuk kemudian disimpan sebagai stok. Sisa biakan digunakan untuk ekstraksi DNA.

Peremajaan *V. parahaemolyticus* dari biakan stok ditumbuhkan kembali pada medium CHROMagar™ Vibrio master, sesuai dengan nomor isolat, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni diambil dan ditumbuhkan lagi dalam LB Broth pada *shaker incubator* pada 37°C selama 24 jam.

e. Ekstraksi DNA Bakteri (DNA Template)

Ekstraksi genom DNA dilakukan dengan metode *Boil Cell Extraction* (BCE). Kultur media yang terdapat dalam tabung eppendorf sebanyak 1 ml disentrifus pada 12.000 rpm selama 1 menit, supernatan dibuang, endapan disuspensikan dalam 1 ml 0,75 % NaCl steril lalu divortex. Dipanaskan dalam air mendidih selama 10 menit. Selanjutnya didiamkan 10 menit dalam lemari pendingin dengan suhu -20°C , setelah itu disentrifus pada 12.000 rpm selama 3 menit, supernatan dipindahkan kedalam tabung eppendorf baru dan siap untuk deteksi gen menggunakan mesin Mesin PCR (Eppendorf Mastercycler gradient®).

f. Pengandaan Gen dengan PCR Spesifik dan Analisa Gen

Pengandaan gen (amplifikasi DNA) bakteri isolat dengan teknik PCR menurut Kim *et al.* (1999) dan (Tada *et al.* (1992). Kondisi optimasi mesin PCR untuk deteksi gen *toxR* *Vibrio parahaemolyticus* pada tiap siklus yakni pradenaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, 35 siklus terdiri dari: denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit,

annealing pada suhu 63°C selama 1,5 menit, extension pada suhu 72°C selama 1,5 menit dan siklus elongation pada suhu 72°C selama 7 menit. Deteksi gen *tdh* dan *trh* optimasi mesin sama, tetapi terdiri dari 30 siklus dengan suhu annealing 55°C selama 1 menit. Reaksi PCR untuk deteksi ketiga gen *toxR*, *tdh* dan *trh* menggunakan *cocktail mixture* terdiri dari: total volume 25,0 µl, 5x Colorless GoTag Reaction Buffer 5,0 µl, 2,5 mM dNTP solution 2,0 µl, DW (steril dH₂O) 14,9 µl, *GoTaq DNA Polymerase* 0,1 µl, *DNA template* 1,0 µl dan sepasang primer solution masing-masing 1 µl. Primer yang digunakan untuk gen *toxR* (teramati pada band 368 bp) adalah Primer 1 (*toxR4*): 5'-GTCTTCTGACG CAATCGTTG-3' dan Primer 2 (*toxR7*): 5'-ATACGAGTGGTTG CTGTCATG-3'. Primer gen *tdh* (terlihat pada band 251 bp), Primer 1 (*tdh-D3=VPD2*): 5'CCACTACCACTCTCAT ATGC-3' dan Primer 2 (*tdh-D5=VPD1*): 5'GGTACTAAATGGCTGACATG-3'. Sedangkan Primer gen *trh* (band 250 bp) adalah Primer 1 (*trh-R2*): 5'-GGCTCAAA ATGGTTAAGCG-3' dan Primer 2 (*trh-R6*): 5'-CATTTCCGCTCTCATATGC-3'.

Analisa gen target yang telah diamplifikasi dilakukan dengan teknik elektroforesis gel agarose 1,5% pada tegangan 100 Volt selama 30 menit. Gel agarose dibuat dalam TBE 1x (Tris-Boric acid-EDTA) dan dicetak dalam wadah. Hasil amplifikasi DNA gen target dengan mesin PCR sebanyak 5 - 10 ml diberi dye solution pada kertas parafilm, dihomogenkan dan dimasukkan dalam lubang kemudian

dielektroforesis. Selanjutnya gel direndam dalam larutan 0,5 µg/ml ethidium bromide selama 15 - 20 menit, lalu dilihat band menggunakan *Gel Documentation System* (Biorad®) DNA yang terdeteksi dibandingkan dengan ukuran pita-pita standar 100 bp DNA ladder. Pita ke-3 (1.000 bp) dan pita ke-8 (500 bp) terlihat paling jelas.

Hasil dan Pembahasan

Hasil isolasi *V. parahaemolyticus* dari sampel kerang air tawar *Batissa violacea* L. dan *Fanus ater* Linn mentah dilakukan 8 kali sampling. Sampel diperoleh dari beberapa pasar di Kota Padang, danau Maninjau dan dari Sungai Sumpo Tanjung Alai Pasaman Timur. Peta lokasi seperti Gambar 1. terlihat pada peta terdapat aliran muara sungai ke laut ke Sungai Sumpo, Pasaman Timur. Sampling sampel mentah ke-1 sampai ke-5 diperoleh dari pasar dan agen di Kota Padang. Sampel dibawa menggunakan wadah tupperware bertutup tanpa es. Hal ini dimaksudkan untuk menghalangi kematian bakteri *Vibrio parahaemolyticus* yang mengkontaminasi, karena pada suhu dingin <-10°C (pada es) *Vibrio parahaemolyticus* cenderung akan mati.¹³ Tiga sampling terakhir dilakukan langsung di tepi Danau Maninjau dan Pasaman Timur, dengan membawa media inokulasi dan peralatan serta dikerjakan secara aseptis. Sampel diambil di dasar Sungai Sumpo Pasaman Timur dan dari danau pada kedalaman 5 m dan jarak dari tepi danau ± 10 m, dengan cara diselami dan menggunakan alat sawuk.



Gambar 1. Peta Lokasi Asal Sampel

Gambaran hasil penghitungan angka kuman metode *Most Probable Number* (MPN) pada isolasi *V. parahaemolyticus*, menunjukkan range MPN/g pada strain isolat *V. parahaemolyticus* dari *Batissa violacea* mentah $VpBv_A$ berkisar 38 -290 MPN/g, sedangkan $VpFa_A$ (*Vp Faunus ater* mentah) range 93-1100 MPN/g. Penghitungan *colony forming unit* (cfu/g) dihitung dari koloni ungu (*purple*) pada media selektif CHROMagar™*Vibrio*, menunjukkan jumlah pada strain isolat $VpBv_A$ berkisar $130 - 5 \times 10^3$ cfu/g, dari 12,5% sampling yang positif tumbuh. Sedangkan $VpFa_A$ berkisar $110 - 1 \times 10^4$ cfu/g dari 50% sampling yang tumbuh positif ungu. Enumerasi cukup tinggi padahal menurut FDA, batas 1×10^4 cfu/g bakteri *V. parahaemolyticus* telah patogen.

Menurut penelitian Cook dkk (2002) jumlah MPN *V. parahaemolyticus* di Mexico pada musim dingin 7,2 MPN/g, musim gugur 500 MPN/g, pada musim semi 1.330 MPN/g, pada musim panas 5.150 MPN/g. Pada penelitian ini pengambilan sampel

dilakukan pada periode Desember-April, kemungkinan memberi pengaruh pada hasil penelitian karena periode tersebut merupakan musim hujan. Pada kondisi musim hujan selain suhu perairan menurun, aliran air tanah dari daratan dan sungai menuju kedaerah lebih rendah (lautan).

Isolat *V. parahaemolyticus* berupa koloni warna ungu sirkular convex violet pada CHROMagar™*Vibrio* (CV) diameter 3 - 5 mm. Media CV ini mengandung substrat untuk aktivitas enzim - galaktosidase yang akan memberi warna ungu (*purple*) dengan adanya senyawa kromogenik dalam media. Media selektif CV agar merupakan media terpilih untuk isolasi halofilik *Vibrio parahaemolyticus* dari sampel makanan dan lingkungan, lebih baik dibandingkan media TCBS. Pada media CV agar warna koloni ungu tetap tidak berubah setelah inkubasi dilanjutkan lebih dari 2 hari, sedangkan pada media TCBS setelah inkubasi lebih dari 24 jam warna hijau akan berubah menjadi hijau kuning atau kehitaman karena pengaruh fermentasi bakteri lain pada TCBS.¹⁴

Hasil penelitian ini seperti pada Tabel 1. Sampel yang menunjukkan koloni isolat ungu, pada *B. violacea* L diperoleh pada sampling kedua. Ditemukan isolat ungu kecil convex dengan ukuran < 2 mm dan cenderung masuk ke dalam media agar. Sedangkan pada sampel *Faunus ater* Linn mentah diisolasi koloni ungu dengan ukuran > 2 mm berbentuk bulat (sirkular), basah dan convex dipermukaan agar. Isolasi terhadap *V. parahaemolyticus* dari *B. violacea* L

berhasil terkumpul 40 kultur uji dan dari *F. ater* L mentah diperoleh 73 kultur. Isolat-isolat lalu diuji gen virulensi *toxR*, *tdh* dan *trh*.

Hasil deteksi gen *toxR* dari 113 isolat *V. parahaemolyticus* seperti dalam Tabel 1.

dan Tabel 2. Gen *toxR* terdeteksi dominan pada isolat VpFa_A sejumlah 34 kultur uji yang positif Sedangkan dari isolat VpBv_A terdeteksi hanya satu gen dari 40 kultur uji yang dideteksi dengan mesin PCR. Hasil ini diragukan sebagai kontaminan *V. parahaemolyticus*.

Tabel 1. Hasil Deteksi Gen pada isolat *V. parahaemolyticus*

Nama Sampel	Kode Isolat	No Sampling	Koloni CHROM-agar™ <i>Vibrio</i>	Jumlah Kultur Uji	Gen <i>toxR</i>	Gen <i>tdh</i>	Gen <i>trh</i>
<i>Batissa violacea</i> L	VpBv _A	ke-2	Ungu kecil dalam media agar	40	(+) 1 gen	(-)	(-)
<i>Faustus ater</i> Linn	VpFa _A	ke-2	Ungu (convex)	73	(+) 4	(-)	(-)
		ke-3	Ungu (convex)		(+) 12	(-)	(-)
		ke-5	Ungu kecil		(+) 8	(-)	(-)
		ke-8	Ungu (convex)		(+) 10	(-)	(-)

Hasil amplifikasi gen *toxR* terlihat pada Gambar 2, pita gen teramati pada band 368 bp. Hasil amplifikasi gen *tdh* dan *trh*, dari semua kultur uji kedua sampel tidak teramati pada elektroforesanya.

Menurut Thompson dan Vanderzant (1976) dalam Dileep (2003)¹⁵ dinyatakan bahwa *V. parahaemolyticus* Kanagawa *tdh* positif (KP+) jumlahnya hanya 1 - 2% dari strain lingkungan.¹⁵

Investigasi secara molekular *Vibrio parahaemolyticus* pada lingkungan air tawar (*freshwater*), telah menunjukkan adanya kontaminasi *V. parahaemolyticus*.¹⁶ Banyak

isolat *V. parahaemolyticus* dari makanan dan lingkungan berupa strain *non-virulent* (KP-), jadi keberadaan faktor-faktor virulensi dari strain harus dideteksi lebih jauh untuk dapat menyatakan isolat *Vibrio parahaemolyticus* patogen (KP+), terutama dari sampel lingkungan.

Gen *toxR* pada *V. parahaemolyticus* ternyata homolog gen *toxR* pada *Vibrio cholerae* (*Vc-ToxR*). Sekuen gen Vp-*toxR* 80% sama dengan *Vc-ToxR*, dan mempunyai region yang sama-sama hidrofobik. Gen *toxR* juga terdeteksi pada *Vibrio fischeri*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio hollisae* dan sekuen

gen telah dianalisa. Disimpulkan bahwa gen *toxR* adalah gen regulator global pada genus *Vibrio sp.* Hasil identifikasi gen kontrol regulator ekspresi gen, diketahui bahwa

produk gen *toxR* (Vp-ToxR) mempromotori ekspresi gen *tdh* dan gen *trh* untuk menghasilkan toksin.⁷

Tabel 2. Persentase jumlah sampling isolat *V. parahaemolyticus*

Kode Sampel	Σ Sampling (kali)	Tidak tumbuh	Koloni tumbuh Chromagar TM Vibrio		Sampling isolat <i>V. para</i> (Σ e/Σ b) %	Jumlah kultur uji	Gen (+) <i>toxR</i> (kultur)	Persentase <i>toxR</i> ⁺ (g/f)%
			d	e				
a	b	c	d	e	12,5% (1/8)	40	1	2.50%
VpBv _A	8	5	2	1				
VpFa _A	8	4	0	4	50% (4/8)	73	34	46,58 %

isolat u.k* (d) = isolat ungu kecil masuk dalam agar
 isolat U** (e) = isolat ungu convex

Meskipun ada kontaminan *V. parahaemolyticus* pada sampel, tetapi tidak terdeteksinya kedua gen virulensi *tdh* dan *trh* dalam penelitian ini, mengindikasikan bahwa isolat-isolat *Vibrio parahaemolyticus* bersifat Kanagawa negatif dengan genotif dinyatakan sebagai *toxR*⁺, *tdh*⁻, *trh*⁻.^{8,9}

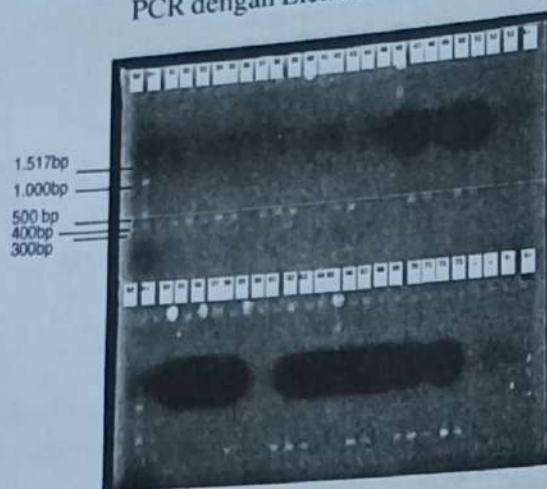
Adanya kontaminasi *Vibrio parahaemolyticus* (*toxR*⁺, *tdh*⁻, *trh*⁻) pada sampel yang berasal dari air tawar pada penelitian ini berkesesuaian dengan hasil publikasi beberapa peneliti yang melakukan investigasi adanya penyebaran bakteri halofilik pada air tawar. Peneliti Sarkar (1983)¹⁷ menyatakan dari 58 sampel plankton air tawar yang diuji, 10 sampel (17,2%) terkontaminasi bakteri *V. parahaemolyticus*, tetapi semua strain isolat

Kanagawa negatif. Sarkar juga menyatakan bahwa 24 – 30% sampel Ikan dari air tawar terdeteksi *V. parahaemolyticus*, dan dari 93 strain isolat yang mengandung gen *toxR*, 29% serotype O:K, tetapi semua negatif gen *tdh* dan gen *trh*.¹⁶ Hasil penelitian Bockemuhl (1985) dari 147 sampling air tawar Sungai Elbe Hamburg diperoleh 42 koloni *V. parahaemolyticus* dan semua Kanagawa negatif.¹⁸

Insiden ditemukan strain *V. parahaemolyticus* KP+ *tdh*⁺*trh*⁺ selama musim panas di lingkungan pantai Jepang mencapai 8,5%. Di Padang, Indonesia isolasi pada sampel air laut, diperoleh 57% (8/14) isolat *V. parahaemolyticus* positif gen *toxR*.¹⁹ Prevalensi dengan persentase tinggi ditemukannya strain *V. parahaemolyticus*



Gambar 1. Deteksi Gen *toxR* Isolat VpBv_A Hasil PCR dengan Elektroforesis



Gambar 2. Deteksi Gen *toxR* Isolat VpFa_A Hasil PCR dengan Elektroforesis

yang membawa gen virulensi *tdh* dan *trh* biasanya diperoleh dari sampel klinis, dan jarang dari strain lingkungan. Di Thailand 76% dari 317 sampel terdeteksi strain pandemik yang membawa *tdh* dan *trh*, KP positif.²⁰

Kontaminasi dan penyebaran *V. parahaemolyticus* pada sampel *B. violacea* L dan *F. ater* Linn dalam penelitian ini terjadi didukung data geografis lokasi tempat hidup berupa sungai bermuara pada laut, sehingga kadar garamnya cukup tinggi karena pasang-

surut air laut dan terjadi distribusi bakteri halofilik ke daerah Sungai Sumpo. Garam natrium merangsang pertumbuhan *Vibrio* sp, pertumbuhan terbaik pada kadar garam 3% NaCl. Sebagai bakteri *autochthonous* (asli) dari laut dan muara sungai (*estuarine waters*) sangat besar kemungkinan *V. parahaemolyticus* mengkontaminasi sampel.⁸ Sumber inokulum dan distribusi halofilik ke lingkungan sekitar sungai adalah juga karena adanya ikan yang dalam ususnya ditempati sementara (*transient*) sel bakteri halofilik. Keberadaan *V. parahaemolyticus* pada *F. ater* Linn dari sungai kemungkinan dibawa ikan muara yang menuju sungai tersebut.¹⁶

Sarkar (1985) juga melaporkan tidak ditemukan bakteri *V. parahaemolyticus* selama musim dingin Desember-Februari di sungai Hooghly Calcutta dan dua danau lainnya. Menurut Sarkar, parameter lingkungan/lokasi air tawar selama penelitian dilakukan juga diamati seperti *salinity* (kadar garam), pH, suhu dan oksigen terlarut perairan air tawar bervariasi. Di Korea prevalensi terjadi penyebaran *V. parahaemolyticus* pada periode Juli-Oktobre. Jadi lama masa penelitian, bulan dan musim pengambilan sampel serta kadar garam memberi pengaruh besar pada pola penyebaran bakteri halofilik ini.²¹

Menurut standar keamanan konsumsi makanan laut di Jepang, pertama jumlah *V. parahaemolyticus* harus kurang dari 100 MPN/g pada seafood yang dimakan mentah. Kedua, suhu selama distribusi dan penyimpanan dibawah 10°C. Ketiga, segera

setelah ditangkap atau dipanen ikan dan kerang-kerangan harus dicuci dengan air bersih atau dengan desinfektan sebelum dimasak.^{13,22}

Simpulan

Sampel mentah kerang *Fanus ater* Linn dan *Batissa violacea* L telah terkontaminasi halofilik *Vibrio parahaemolyticus*, tetapi tidak patogen. Sampel yang diambil dari sungai bermuara ke laut, aman dikonsumsi dengan diolah secara higienis dan dimasak sempurna.

Daftar Pustaka

1. CDC (the Centers for Disease Control and Prevention). 2005. *Emerging Infectious Diseases* (letters) .Vol.11. No.7.
2. Matsumoto, C., Okuda, J., Ishibashi, M., Iwanaga, M., Garg, P., Ramamurthy, T., Wong, H., DePaola, A., Kim, Y. B., Albert, M. J. M & Nishibuchi, M. 2000. Pandemic spread of an 03:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and *toxRS* Sequence Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. 38. (2). 578-585.
3. Tada, J., Ohashi, T., Nishimura, N., Shirasaki, Y., Ozaki, H. & Nishibuchi, M. 1992. Detection of the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (*trh*) of *Vibrio parahaemolyticus* by Polymerase Chain Reaction. *Molecular and Cellular Probes*. 6 477-487.
4. Siraj, D. S. Bartlett, J. A. & Hyslop, N. 2002. An infected laceration. *Infection Medicine*. 19. 53-65.
5. Brooks, G.F., Butel, J.S. & Morse, S.A. 2008. *Mikrobiologi Kedokteran Jawetz Melnick & Adelberg*; alih bahasa Huriawati Hartanto. dkk. Ed.23. Penerbit EGC. Jakarta.
6. Kim, Y.B., Okuda, J., Matsumoto, C., Takahashi, N., Hashimoto, S. & Nishibuchi, M. 1999. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. *Journal of Clinical Microbiology*. 37 (4) 1173-1177.
7. Lin, Z., Kumagai, K., Baba, K., Mekalanos, J. J., & Nishibuchi, M. 1993. *Vibrio parahaemolyticus* has a homolog of the *Vibrio cholerae* *ToxRS* operon that mediates environmentally induced regulation of the thermostable direct hemolysin gene. *Journal of bacteriology* Vol. 175. No. 12. p3844-3855
8. Nishibuchi, M., Fasano, R., Russell, G. & Kaper, J. B. 1992. Enterotoxigenicity of *Vibrio parahaemolyticus* with and without genes encoding thermostable direct hemolysin. *Infection Immunity*. 60. p3539-3545.
9. Pong-Masak, P.R. & Pirzan, A.M. 2006. Komunitas makrozoobentos pada kawasan budidaya tambak di Pesisir Malakosa Parigi-Moutong Sulawesi Tengah. *Biodiversitas*. Vol. 7 No. 4
10. Hatha, A.A.M., Christi, K.S., Singh, R. & Kumar, S. 2005. Bacteriology of the fresh water bivalve clam *Batissa violacea* (Kai) sold in the Suva Market.

- The South Pacific Journal of Natural Science*, 23: 48-50.
11. Yuwono, T. 2006. *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction*. Penerbit Andi: Yogyakarta
 12. Sambrook J. & Russel D.W. 2001. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. Volume 1,2,3. Third Edition. CSHL Press. New York
 13. Lake, R., Hudson, A. & Cressey, P. 2003. *Risk Profile: Vibrio parahaemolyticus In Seafood*. Institute Of Environmental Science and Research Limited Report. New Zealand.
 14. Hara-Kudo, Y. *et al.* 2003. Prevalence of pandemic thermostable direct hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in seafood and the coastal environment in Japan. *Applied And Environmental Microbiology*. Vol. 69. No. 7. p. 3883-3891
 15. Dileep, V., Kumar, H.S., Kumar, Y., Nishibuchi, M., Karunasagar, I. & 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
 16. Sarkar, B. L., Nair, G. B., Banerjee, A. K. & Pal, S. C. 1985. Seasonal distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in freshwater environs and in association with freshwater fishes in Calcutta. *Appl. Environ. Microbiol.* 49 (1):132-136
 17. Sarkar, B. L., Nair, G. B., Sircar, B. K. & Pal, S. C. 1983. Incidence and level of *Vibrio parahaemolyticus* associated with freshwater plankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:288-290
 18. Bockemühl, J., Roch, K., Wohlers, B., Aleksic, V., Aleksic, S. & Wokatsch, R. 1985. Seasonal distribution of facultatively enteropathogenic vibrios (*Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio parahaemolyticus*) in the freshwater of the Elbe River at Hamburg. *Journal of Applied Microbiology* Volume. 60. Issue 5 p435 - 442
 19. Marlina. 2008. Identifikasi bakteri *Vibrio parahaemolitycus* dengan metode biolog dan deteksi gen *toxR* nya secara PCR. *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi*, Vol. 13. No. 1.
 20. Laohaprerththisan, V., Chowdhury, A., Kongmuang, U., Kalnauwakul, S., Ishibashi, M., Matsumoto, C. & Nishibuchi, M. 2003. Prevalence and serodiversity of the pandemic clone among the clinical strains of *vibrio parahaemo-lyticus* isolated in Southern Thailand. *Epidemiol. Infect.* 130. 395-406.
 21. Lee, J. K., Jung, D. W., & Eom, S. Y. 2007. Occurrence of *Vibrio parahaemo-lyticus* oysters from Korean Retail Outlets. *Food Control*. 10.006 p.1-5
 22. CCFH. 2002. *Discussion Paper On Risk Management Strategies For Vibrio Spp. In Seafood*. Thirty-Fifth Session Codex Committee On Food Hygiene. Joint FAO/WHO Food Standards Programme