

**ISOLASI DAN DETEKSI GEN *toxR*, *tdh*, dan *trh*
BAKTERI *Vibrio parahaemolyticus* PADA IKAN
BALEDANG(*Trichiurus lepturus*, Linn) DENGAN
METODA *POLYMERASE CHAIN REACTION*
(PCR)**

SKRIPSI SARJANA FARMASI

Oleh

ASRI DIAN
No.BP : 05931051



**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG
2011**

ABSTRAK

Telah dilakukan studi gen *toxR*, *tdh*, dan *trh* pada bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dari sampel ikan baledang yang diperoleh dari Muaro Padang. Tahap isolasi bakteri didahului dengan menginokulasi sampel dalam medium isolasi selektif *Salt Polymyxin Broth* (SPB) dan medium pertumbuhan selektif CHROMAgarTM *Vibrio*. Hasil isolasi menunjukkan bahwa sampel ikan baledang mengandung bakteri *V. Parahaemolyticus* yang ditandai dengan timbulnya koloni berwarna ungu. Selanjutnya dilakukan uji penegasan dengan metoda *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Hasil amplifikasi PCR dideteksi dengan proses elektroforesa gel dan dari tiga puluh delapan kultur yang diisolasi memberikan hasil dua puluh tujuh kultur positif gen *toxR* dan tidak satupun kultur yang positif gen *tdh* dan *trh*.

I. PENDAHULUAN

Sebagian besar wilayah di bumi dikelilingi oleh lautan, sehingga sumber bahan makanan banyak yang berasal dari laut. Ikan, kerang-kerangan, cumi dan udang merupakan beberapa *seafood* yang cukup digemari karena rasanya yang lezat dan bergizi tinggi. Hasil laut yang paling banyak dikonsumsi oleh masyarakat adalah ikan karena ikan paling mudah diperoleh dan memiliki jenis yang beragam, seperti ikan baledang (*Trichiurus lepturus*. Linn) yang menjadi salah satu komoditas ekspor Indonesia (Ambarwati, 2008). Ikan baledang sangat mudah dikenali dari bentuknya yang panjang dan pipih. Ikan ini dikenal dengan berbagai macam nama lokal yaitu ikan layur (Jawa), melei (Palabuhanratu), baledang (Padang), lajuru (sulawesi selatan), romu (Ambon), dan lajur (Madura). Baledang merupakan tipe ikan predator, yang memakan ikan kecil, udang kecil dan cumi-cumi kecil.

Keamanan mengonsumsi *seafood* mulai menjadi perhatian setelah terjadinya wabah *foodborne disease* yang diduga karena infeksi *Vibrio parahaemolyticus* pada awal tahun 1950 di Jepang, dan semenjak tahun 1996 mulai pandemik di negara-negara Asia dan Amerika (Wong, 2003; Hara-Kudo, 2003). Menurut Nair *et al.* (2007), Indonesia termasuk salah satu wilayah penyebaran kasus pandemik yang disebabkan oleh bakteri *V. parahaemolyticus*.

Bakteri *V. parahaemolyticus* adalah bakteri Gram negatif berbentuk batang bengkok, anaerob fakultatif dan bersifat halofilik, yang patogen pada manusia (Wong *et al.*, 1999; Wong, 2003; Nair, *et al.*, 2007; Sujeewa *et al.*, 2009). Infeksi dapat terjadi karena mengonsumsi makanan yang terkontaminasi oleh bakteri patogen, makanan yang dimasak setengah matang, atau makanan yang dikonsumsi tanpa

dimasak (Lida, *et al.*, 1998; Wong, 2003; Okuda *et al.*, 1997;), dengan gejala yang ditimbulkan adalah gastroenteritis yang sifatnya akut.

Bakteri *V. parahaemolyticus* mempunyai gen spesifik yaitu *toxR*. Keberadaan gen ini tidak bersifat patogen terhadap manusia. Namun *V. parahaemolyticus* menghasilkan gen-gen virulen yang sifatnya patogen yaitu gen *tdh* yang bertanggungjawab terhadap produksi toksin berupa *Thermostable Direct Hemolysin* (TDH) dan gen *trh* yang memproduksi toksin *TDH-Related Hemolysin* (TRH). Tingkat virulen *V. parahaemolyticus* tidak dipengaruhi oleh jumlah *V. parahaemolyticus* tersebut, tapi sangat tergantung pada toksin yang dihasilkan gennya (Wong, 2003; Sujeewa *et al.*, 2009). Mekanisme patogen *V. parahaemolyticus* sangat berhubungan dengan adanya produksi gen *tdh* dan *trh*, yang memberikan respon terhadap β -hemolisis (Marlina, 2008).

Penelitian mengenai adanya gen virulen pada bakteri *V. parahaemolyticus* telah dideteksi pada beberapa jenis *seafood* diantaranya udang putih (*Penaeus mergensis*), udang kelong (*Penaeus indicus*), pansi (*Corbicula moltkiana*. Prime) dan langkitang (*Faunus ater*) (Marlina, *et al.*, 2007; Mudaris, 2009; Azyenela, 2009). Pada penelitian ini dilakukan deteksi gen *toxR* dan gen virulen pada ikan baledang dengan menggunakan metoda PCR. Dengan adanya penelitian ini diharapkan dapat diperoleh data mengenai keberadaan gen *toxR* dan gen virulen bakteri *V. parahaemolyticus* yang terdapat pada sampel ikan baledang.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat diambil kesimpulan bahwa pada sampel ikan baledang (*T. lepturus*) yang diperoleh dari Muaro Padang, Sumatera Barat terdapat bakteri *V. parahaemolyticus*. Dan dari 38 kultur bakteri *V. parahaemolyticus* yang dideteksi memberikan hasil 27 kultur positif gen *toxR*, dan tidak satupun kultur yang positif gen *tdh* dan gen *trh*.

5.2 Saran

Disarankan kepada peneliti selanjutnya untuk melakukan identifikasi jenis *Vibrio* lain seperti *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio fulmiticus*, dan *Vibrio cholera* dengan metode PCR pada sampel *T. lepturus*.

DAFTAR PUSTAKA

Agus, S., Ardilfiet, C., Amin, S., Anis, K., Santoso., Hasrul, H., Budiman, B., Soermarsono, F., Abdul, R., Karsinah., Lina, I., Lucky, H.M., Mardiasuti, H.W., Mathilda, L., Miriam, T., Asmono., Pratiwi, S., Retno, I.S., Robert, U., Sardjito., Suharno, J., Suharto., Suhud, S., Sujudi., Susiana, A., Tertia, H., Miraawati, S., dan Usman, C.W. 1994, *Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran*, Edisi revisi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia : Jakarta.

Ambarwati, D.V.S. 2008. *Studi Biologi reproduksi Ikan layur (Superfamili trichiuroidea) di perairan Palabuhanratu, Kabupaten Sukabumi, Jawa Barat*. (Skripsi). Bogor : Institut Pertanian Bogor.

Azyenela, L. 2009. *Deteksi Gen Virulen Bakteri Vibrio parahaemolyticus Dari sample Pensi (Corbicula molckiana. Prime) Dan Langkitang (Faunus ater) Dengan Metoda Polymerase Chain Reaction (PCR)*. (Skripsi). Padang : Universitas Andalas.

Ansaruzzaman, M., MarcelinoLucas., JacquelineL.Deen., N.A.Bhuiyan., Xuan-YiWang., AshrafusSafa., MarziaSultana., A.Chowdhury., G.BalakrishNair., DavidA.Sack., LorenzvonSeidlein., MaheshK.Puri., MohammadAli,Claire-LiseChaignat., John D.Clemens., & Avertino Barreto. 2005. Pandemic serovars (O3:K6 and O4:K68) of *Vibrio parahaemolyticus* Associated with Diarrhea in Mozambique: Spread of the Pandemic into the African Continent. *Journal Of Clinical Microbiology*. Vol. 43. No.6. p2559-2562.

Benson. 2001. *Microbiological Applications Laboratory Manual in General Microbiology*. 8th ed. The McGraw-Hill Companies:US.

Bhuiyan, N, Januari 2002. "Prevalence of Pandemic Genotype of *Vibrio parahaemolyticus* in Dhaka, Bangladesh, and Significance of its distribution across Different Serotype" *Journal of Clinical Microbiology*, Vol 40, P 284-286.

Brooks, G.F. Butel, J.S. & Morse, S.A. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran* (ed.I). Jakarta : Salemba Medika.

Cabrera-García, M.E, Carlos Vázquez-Salinas, & Elsa Irma Quinones-Ramirez. 2004. Serologic and Molecular Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* Strains Isolated from Seawater and Fish Products of the Gulf of Mexico. *Applied And Environmental Microbiology*, Vol. 70. No. 11. P. 6401-6406.

Charles-Hernández, G.L., MSc, Enrique Cifuentes, Stephen J. Rothenberg. 2005. Environmental factors associated with the presence of *Vibrio parahaemolyticus* in sea products and the risk of food poisoning in communities bordering the Gulf of Mexico. *Journal of Environmental Health Research*. Vol. 5 issue 2: 75-80.

CHROMAgar™, "CHROMAgar™ Vibrio", <http://chromagar.com/products/Vibrio>, 2003.

Clark, D. P., and L. Russel, 1997. *Molecular Biology: Made Simple and Fun*, 1st Ed, Coche River Press, USA.

Dennis Kunkel Microscopy, Inc, 2004. Science Stock Photography. Image number 20178D diakses 23 Oktober 2010 dari www.denniskunkel.com/DK/Medical/20178D.html.

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.

DePaola, A. J. Ulaszek, J C. A. Kaysner & B. J. Tenge 2003 “Molecular Serological and Virulence Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from Environmental Food and Clinical Sources in North America & Asia” *Applied and Environmental Microbiology*. 69. p3999-4005.

Djuhandi, T. 1981. *Dunia ikan*. Armico. Bandung.

Doyle, M. P & Dekker, M, 1989, *Foodborne Bacterial Pathogens*, New york.

Dwidjoseputro, 1988, *Dasar-dasar Mikrobiologi*, Djambatan, Jakarta.

Farabee, M.J. 2007. Biological Diversity: Bacteria And Archaeans diakses 23 Oktober 2010 dari <http://www.emc.maricopa.edu/faculty/farabee/biobk/biobookdiversity2.html>.

Fujino, T. Okuno, Y. Nakada, D. Aoyama, A. Fukai, K. Mukai, T. & Ueho T. 1953. On the Bacteriological Examination of Shirasu Food Poisoning. *Medical Journal of Osaka University*. 4. p299–304.

Gerard *et al*, 1982 *Mikrobiologi untuk Laboratorium dan Klinik*, PT. Gramedia: Jakarta.

Hara-Kudo, Y., Kanji Sugiyama., Mitsuaki Nishibuchi., Ashrafuzzaman Chowdhury., Jun Yatsuyanagi., Yoshimitsu Ohtomo., Akinobu Saito., Hidetoshi Nagano., Tokuhiko Nishina., Hiroshi Nakagawa., Hirotaka Konuma., Michiko Miyahara., & Susumu Kumagai. 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. p3883–3891.

Jamsari., 2007. “*Bioteknologi Pemula, Prinsip Dasar dan Aplikasi Analisis Molekuler*”, Unri Press : Pekanbaru.

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.

Krieg, N.P., and J.G. Holt(ed). 1984. “*Bergey Manual Systematic Bacteriology*, Williams and Wincken: Baltimore.

Laohaprertthisan, V., A. Chowdhury., U. Kongmuang., S. Kalnauwakuli., M. Ishibashi., C. Matsumoto., & M. Nishibuchi. 2003. Prevalence and serodiversity of

the pandemic clone among the clinical strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated in southern Thailand. *Epidemiol.Infect.* 130.395–406.

Lida,T., Kwon-Sam,P., Orasa,S., Junji,K., Yoshiharu,Y., Koichiro,Y and Takeshi,H. 1998. Close proximity of the *tdh*, *trh* and *use* genes on the chromosome of *Vibrio parahaemolyticus*. *Department of Bacterial Infections, Research Institute for Microbial Diseases*, Vol 144, p2517-2523.

Lin, Z. Kumagai, K. Baba, K. Mekalanos, J. J. Nisibuchi, 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.

Marlina. 2008. Identifikasi Bakteri *Vibrio parahaemolitycus* Dengan Metoda Biolog dan Deteksi Gen *ToxR* nya Secara PCR. *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi*, Vol. 13, No. 1, Hal 1-7.

Marlina., Son Radu., C. Yoke Kqueen., Suhaimi,N., Zunita,Z., Sahilah Abd Mutalib and Mitsuaki,N. 2007. Detection of *tdh* And *trh* Genes In *Vibrio parahaemolyticus* Isolated From *Corbicula moltkiana* Prime In West Sumatra, Indonesia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, Vol 3, No. 2, Hal 349-355.

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 O3: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.

Mudaris, F. 2009. *Isolasi dan Deteksi Vibrio parahaemolyticus Pada Udang Putih (Penaeus merguensis) dan Udang Kelong (Penaeus indicus) Dengan Metoda PCR*. Skripsi Fakultas farmasi Universitas Andalas : Padang.

Murray, R. K., D. K. Granner, P. A. Mayes and V. W. Rodwell, , 2003 *Biokimia Harper*, edisi 25, diterjemahkan oleh Andry Hartono, Penerbit Buku Kedokteran EGC: Jakarta.

Nair, G. Balakrish., Thandavarayan,R., Sujit K, Bhattacharya., Basabjit,D., Yoshifumi,T., and David A, Sack. 2007. Global Dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* Serotype O3:K6 and Its Serovariants. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 20, No. 1, p39-48.

Nakamura, I. dan N. V. Parin. 1993. Snake Mackerels and Cutlassfishes of The World. *FAO Species Catalogue No. 125 Vol. 15*. FAO.

Nishibuchi, M.A. 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.

Okuda, J., Masanori, I., S. L. Abbott., M. Janda., and M. Nishibuchi. 1997. Analysis of the Thermostable Direct Hemolysin (*tdh*) Gene and the *tdh*-Related Hemolysin (*trh*) Genes in Urease-Positive Strains of *Vibrio parahaemolyticus* Isolated on the West Coast of the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 35, No. 8, p. 1965–1971.

Pelczar, M. J., dan E. C. S. Chan, , 1988. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*, Jilid II, diterjemahkan oleh Ratna. S. H, UI-Press: Jakarta.

Provenzano, D., Darren .A, Schuhmacher., Justin. L, Barker and Karl. E, Klose. 2000. The Virulence Regulatory Protein ToxR Mediates Enhanced Bile Resistance in *Vibrio cholerae* and Other Pathogenic *Vibrio* Species. *Infection and Immunity*, Vol 68, No. 3, p. 1491–1497.

Sambrook J. & Russel D.W. 2001. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. Volume 1. Third edition. CSHL Press. New York.

Schlegel, H.G., 1994. *Mikrobiologi Umum*, Edisi ke-6, diterjemahkan oleh Tedjo Baskoro, UGM Press : Yogyakarta.

Singleton, P & P. Sainsbury, 1981. *Introduction to Bacteria*, John Wiley & Sons Ltd : New York.

Sujeewa. A.K.W, Norrakiah, A. S. and Laina, M. 2009. Prevalence of toxic genes of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimps (*Penaeus monodon*) and culture environment. *International Food Research Journal* 16: 89-95.

Tada , J., Tetsuo Ohashi., Naoyuki Nishimura., Yoshinari Shirasaki., Hiroko Ozaki., Shigeru Fukushima., Jun Takano., Mitsuaki Nishibuchi & Yoshifumi Takeda. 1992. Detection of the thermostable direct hemolysin gene (*tdh*) and the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (*trh*) of *Vibrio parahaemolyticus* by polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular probes*. 6:477-487.

Vierstraete, A. 08 November 1999. Principle of the PCR. Diakses 23 Oktober 2010 dari www.wiezoekje.nl/andy-vierstraete.

Volk, A.W dan Wheeler, M.F. 1993. *Mikrobiologi Dasar* (5th Ed), diterjemahkan oleh Soenartono, Adi Soematro, Penerbit Airlangga: Jakarta.

Wong, Hin-Chung. 2003. Detecting and Molecular Typing of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol. 11, No. 2, Pages 100-107.

Wong, Hin-Chung., Shu-Hui Liu., Lee-Wen Ku., I-Ying Lee., Tien-Kuei Wang., Yeong-Sheng Lee., Chih-Lung Lee., Li-Ping Kuo and D. Yang-Chih Shih. 1999. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolates obtained from Food Poisoning Outbreaks during 1992-1995 in Taiwan, *JFP* 99-289, p1-31.

Yuwono, T., 2006. *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction*, Penerbit
Anda: Yogyakarta.