

## A. Judul Penelitian dan Nama Peneliti

### a. Judul Penelitian :

**PENGEMBANGAN METODE DETEKSI CEPAT BAKTERI  
*Vibrio parahaemolyticus* SECARA MOLEKULAR DENGAN  
TEKNIK POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)**

### b. Nama Peneliti : Marlina

### c. Tahun Penulisan Laporan :

Laporan penelitian ini berjumlah 15 halaman. Penelitian dan penulisan laporan dilakukan pada tahun 2005.

### d. ABSTRAK

*Vibrio parahaemolyticus* merupakan mikroorganisme yang dapat dijumpai di perairan seperti air tawar dan air asin, biasanya berasosiasi dengan hewan akuatik seperti ikan, udang, kepiting, dan kerang. Bakteri ini dapat menginfeksi manusia melalui makanan atau air yang terkontaminasi oleh feses manusia, terutama melalui makanan yang tidak dimasak sempurna atau mentah. Dari tiga jenis kerang-kerangan, yaitu *Corbicula molukiana* (pensi), *Batissa violaceae* (lokan) dan *Fanus ater* (langkitang) yang diambil langsung di habitatnya, yaitu dari Danau Singkarak, Danau Maninjau dan Sungai Oman di Pesisir Selatan, Sumatera Barat, juga dikumpulkan sampel dari tiga pedagang di tiga Pasar di Kota Padang, dan dari sampel lingkungan seperti limbah rumah sakit, sampel diambil dari 5 Rumah Sakit di kota Padang dan air laut, diambil sampel dari 2 pantai, yaitu Pantai Bungus Padang dan Pantai Pasir Jambak Padang. Untuk sampel klinis berupa feses pasien diare,

---

<sup>1</sup> Dibiayai oleh Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi

Dengan Nomor kontrak : 018/SPPP/PP/DP3M/IV/2005, tanggal 11 April 2005

<sup>2</sup> Penulis adalah dosen Fakultas MIPA Jurusan Farmasi Universitas Andalas

sampel dikumpulkan dari pasien yang dirawat di Rumah Sakit Umum M.Jamil Padang. Dari semua sampel telah berhasil diisolasi bakteri *Vibrio parahaemolyticus* menggunakan media TCBS Agar, dilanjutkan dengan media CHROMAgar Vibrio, dimana warna koloni bakteri ini ungu. Untuk uji konfirmasi nya digunakan teknik PCR, dimana telah berhasil dideteksi gen *toxR* yang merupakan gen regulator pada bakteri *Vibrio parahaemolyticus* ini. Dari 200 isolat *Vibrio parahaemolyticus* yang diperoleh, 100 isolat positif mengandung gen *toxR*. Untuk sampel klinis juga dideteksi keberadaan gen virulen, yaitu gen *tdh* dan *trh*. Dari 17 isolat *Vibrio parahaemolyticus* yang positif mengandung gen *toxR*, 2 kultur positif mengandung *tdh* dan tidak ada satupun kultur yang mengandung gen *trh*.

#### ABSTRACT

*Vibrio parahaemolyticus* is a bacterium that has been found and associated with human diarrhea episodes affecting hundreds of people in extensive geographic areas and often associated with the consumption of raw or undercooked seafood. In this research, *Vibrio parahaemolyticus* was isolated from three types of mollusks (*Batissa violacea* Lamarck, *Fanus ater* and *Corbicula moltkiana* Prime), were collected from Lake Singkarak, Lake Maninjau and Oman River in West Sumatera Province, waste water samples in the hospital, sea water samples from two kind of beach, Bungus Beach and Pasir Jambak Beach, and clinical samples from diarrhea patient in M. Djamil Hospital in Padang, West Sumatra Province. A total of 200 isolates were studied for the presence or absence of regulatory gene (*toxR*), and virulence genes (*tdh* and *trh*), where 100 isolates gave the positive results for *toxR* gene and 2 of 17 isolates from clinical samples were positive for *tdh* gene.



## I. PENDAHULUAN

*Vibrio* merupakan organisme yang banyak dijumpai di perairan dunia seperti air tawar, air asin dan berasosiasi dengan hewan akuatik seperti ikan, udang, kepiting, dan kerang. Beberapa spesies dari genus *Vibrio* ini merupakan bakteri patogenik yang sering menginfeksi manusia melalui makanan atau air yang terkontaminasi oleh feses manusia, terutama melalui makanan yang tidak dimasak sempurna atau mentah, diantaranya adalah *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio alginolyticus* dan *Vibrio vulnificus*.

Salah satu hewan akuatik yang dapat dikontaminasi oleh *Vibrio parahaemolyticus* adalah *Corbicula molliana* yang dikenal oleh masyarakat Sumatera Barat dengan nama "Pensi" dan merupakan bahan makanan yang banyak dikonsumsi oleh masyarakat. *Corbicula molliana* bisa dijumpai di danau dan di laut. Daerah pinggir danau dan laut ini banyak dijadikan sebagai tempat kegiatan masyarakat baik sebagai pemukiman, maupun tempat rekreasi.

Hewan akuatik lainnya yang juga bisa terkontaminasi dengan *Vibrio parahaemolyticus* adalah *Fanus ater* (langkitang) dan *Batissa violaceae* (lokan). Hewan akuatik ini juga sering dikonsumsi sebagai bahan makanan. Apabila hewan-hewan ini diolah dengan tidak semestinya akan dapat menyebabkan diare bila dikonsumsi.

Untuk melihat apakah diare tersebut disebabkan oleh bakteri *Vibrio parahaemolyticus* yang dikontaminasi pada makanan, air laut maupun dari limbah rumah sakit, maka dapat ditentukan secara cepat penyebab penyakit gastroenteritis yang disebabkan bakteri ini dengan teknik Polymerase Chain Reaction (PCR).

## II. TINJAUAN PUTAKA

### 2.1 Bakteri

Bakteri adalah suatu organisme prokariotik, bersel tunggal yang sangat beragam dan dapat hidup di tempat yang memungkinkan terjadinya kehidupan seperti udara, tanah, air dan makanan (19). Bakteri dapat bersimbiosis dengan organisme lain di alam dimana simbiosis ini dapat bersifat parasitisme,

komensalisme dan mutualisme. Sifat parasitisme ini menimbulkan penyakit pada tumbuhan, hewan dan manusia.

## 2.2 *Vibrio parahaemolyticus*

Pada tahun 1950, seorang ilmuwan yang bernama Fujino untuk pertama kalinya melaporkan bahwa bakteri *Vibrio parahaemolyticus* menjadi penyebab keracunan akibat mengkonsumsi makanan laut yang terjadi di Osaka, Jepang. *V. parahaemolyticus* diisolasi dari ikan sardin yang dikonsumsi oleh pasien yang ternyata juga terdapat pada sampel usapan rektal dari pasien. Sejak saat itu bakteri *V. parahaemolyticus* sering dilaporkan menjadi penyebab keracunan akibat mengkonsumsi makanan laut di seluruh negara di dunia. *Vibrio parahaemolyticus* merupakan bakteri yang termasuk dalam famili Vibrionaceae/ Spirillaceae dan genus *Vibrio*.

## 2.3 Kerang

Kerang merupakan hewan perairan yang hidup didalam air laut, air tawar dikonsumsi masyarakat sebagai bahan makanan yang banyak kandungan gizinya. Hewan ini bertubuh lunak, tidak bersegmen, banyak diantaranya dilindungi oleh suatu cangkang (*univalvia*) yang terbuat dari kapur (kalsium karbonat ). Kerang yang banyak dikonsumsi antara lain langkitang (*Fannus ater*), lokan (*Batissa violaceae*) dan pensi (*Corbicula moltkiana*) Pada kerang-kerangan ini dapat ditemukan berbagai organisme antara lain *Serratia*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus* dan *Micrococcus*.

## 2.4 Laut

Laut dimanfaatkan untuk dimanfaatkan untuk berbagai keperluan seperti transportasi, perikanan, pertambangan, konservasi alam, pertahanan keamanan, pertambangan, sumber bahan baku obat-obatan, pendidikan dan penelitian serta untuk pariwisata, di lain pihak juga mengalami kerusakan atau pencemaran yang dapat berasal dari darat ataupun dari kegiatan di laut itu sendiri. Pencemaran dapat dibagi 3 jenis yaitu :



1. Pencemaran fisik berasal dari pasir dan tanah sehingga akan menyebabkan warna air menjadi keruh.
2. Pencemaran kimia berasal dari, limbah rumah sakit, limbah pertanian, limbah-limbah industri yang banyak mengandung fosfat, nitrat, dll.
3. Pencemaran biologi berasal dari feses manusia.

Perairan laut merupakan tempat hidup berbagai mikroorganisme dan makroorganisme. Antara mikroorganisme dan makroorganisme akan terjadi interaksi seperti bakteri akan bersimbiosis dengan organisme yang hidup diperairan seperti plankton, zooplankton, ikan, udang, kerang, dll.

Kedaaan salinitas laut sangat memungkinkan bagi bakteri halofilik untuk hidup. Beberapa genus yang ditemukan yaitu : *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium* dan *Achromobacter*. Kadar garam di laut dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti pola sirkulasi air, penguapan, curah hujan dan aliran sungai. Menurut Valikangas, air dapat diberi nama berdasarkan kadar garamnya : air tawar 0-0,5‰, air payau 0,5-12 ‰ dan air laut dengan kadar gram lebih dari 17‰ (15).

## 2. 5 Limbah Cair Rumah Sakit

Limbah cair rumah sakit adalah semua bahan buangan yang berbentuk cair yang berasal dari rumah sakit yang kemungkinan mengandung mikroorganisme patogen, bahan kimia beracun dan radioaktivitas

### 1. Mikroba patogen

Di dalam limbah cair terkandung mikroba patogen enterik, seperti bakteri, virus dan cacing yang sangat mudah menyebar melalui perantara air. Mikroba tersebut berasal dari tinja pasien penyakit saluran pencernaan.

### 2. Bahan kimia dan obat-obatan

Pencemaran zat-zat kimia terjadi pada proses pembersihan, desinfeksi operasi. Sedangkan pencemaran obat-obatan berasal dari obat yang melengket pada baju, tertumpah dan kadaluarsa lalu terbuang ke saluran air.

### 3. Isotop radioaktif

Berasal dari zat-zat radioaktif yang digunakan dalam diagnosa dan pengobatan penyakit.

## 2.6 Diare

Diare terjadi akibat pergerakan yang cepat dari materi tinja sepanjang usus besar dan memiliki konsistensi sangat encer. Penyakit diare ini selalu disertai dengan sakit perut, mual dan muntah.

Diare yang terjadi kurang dari 2 minggu, yang disebut juga dengan gastroenteritis dapat disebabkan oleh :

### a. Bakteri

Bakteri masuk ke dalam tubuh manusia melalui makanan ataupun air yang telah terkontaminasi serta makanan yang telah teracuni oleh toksin yang dihasilkan bakteri. Contoh bakterinya yaitu *Escherichia coli*, *Campylobacter*, *Salmonella* (non-typhoid), *Shigella*, *Aeromonas* dan spesies-spesies *Vibrio*.

### b. Parasit

Parasit ini masuk ke dalam tubuh manusia melalui makanan maupun air yang terkontaminasi. Infeksi parasit disebabkan oleh parasit itu sendiri maupun oleh bentuk inaktifnya. Contohnya yaitu *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Cyclospora cayentanensis* dan *Cryptosporidium parvum*.

### c. Virus

Virus ini masuk ke dalam tubuh manusia melalui makanan maupun minuman yang terkontaminasi. Diare yang disebabkan akan disertai dengan mual, muntah dan demam. Contohnya Rotavirus, Adenovirus, Norwalk virus, Astrovirus dan Calicivirus.

### d. Obat

Suatu obat dapat memberikan efek samping diare, seperti laksatif, antasid (yang mengandung magnesium), antibiotik (klindamisin, tetrasiklin, sulfonamid dan antibiotik spektrum luas lainnya), antihipertensi (reserpin, guanetidin, metildopa, guanadrel, guanabenz), kolinergik (betanekol, metaklopramid, neostigmin) dan obat jantung (kinidin, digitalis dan digoksin).



Diare akut ini dapat diobati dengan penggantian cairan elektrolit tubuh, pemberian antibiotik untuk diare yang disebabkan oleh bakteri, pemberian antivirus untuk diare yang disebabkan virus dan pemberian absorben.

### **III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN**

#### **3.1 Tujuan Penelitian**

Tujuan penelitian ini untuk mengisolasi bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dari air laut, berbagai kerang, limbah rumah sakit dan sampel klinis serta mengidentifikasi bakteri tersebut secara cepat dengan menggunakan teknik Polymerase Chain Reaction (PCR).

#### **3.2 Manfaat Penelitian**

Sampai saat ini belum tersedia dan tersebar secara menyeluruh suatu alat atau metoda yang dapat secara cepat memastikan penyebab penyakit yang ditimbulkan karena keracunan makanan tertentu, terutama yang disebabkan oleh bakteri *Vibrio parahaemolyticus*. Di kota-kota besar Indonesia seperti Jakarta, Surabaya, Bandung kondisi ini dapat di perkecil karena banyak terdapat Rumah Sakit yang sangat modern dan tersedianya para pakar dalam bidang ini. Tetapi untuk kota-kota kecil seperti Padang, Pekanbaru dan puluhan kota lain di Indonesia akan kesulitan untuk mendapatkan fasilitas ini, karena rumah sakit-rumah sakit umum yang ada tidak memadai dan tidak mempunyai dana yang cukup dalam penanganan suatu penyakit tertentu, seperti diare yang harus ditangani secara cepat dan tepat.

### **IV. METODE PENELITIAN**

#### **4.1 Alat dan Bahan**

##### **4.1.1 Alat**

Jarum ose, spatel, batang pengaduk, beaker glass, cawan petri, erlenmeyer, hot plate, jangka sorong, kapas lidi, effendorf, lemari pendingin (Panasonic<sup>®</sup>), lampu spiritus, lampu UV, pot salep, pinset, pipet mikro (Transferpette<sup>®</sup>),

sentrifugator (Hettich<sup>®</sup>), timbangan digital (Mettler PM 200<sup>®</sup>), *water bath* (Primatama<sup>®</sup>), vortex, autoklaf (All American<sup>®</sup>), inkubator (Gallenkamp<sup>®</sup>), *Rotary shaker* inkubator (Thermolyne<sup>®</sup>), *laminar air flow* (Esco<sup>®</sup>).

#### 4.1.2 Bahan

Sampel berupa limbah cair, yaitu air selokan lima Rumah Sakit di kota Padang, Sumatra Barat, Media CHROMagar Vibrio (CHROMagar<sup>™</sup>), media Thiosulfat Citrate Bile Sucrose (TCBS) Agar (Eiken<sup>®</sup>), media Alkaline Pepton Water (APW), media Luria Burtani (LB) broth, media Mueller Hinton (Merck<sup>®</sup>), aquadest steril, etanol 70%, disk antibiotik (Oxoid dan BBL<sup>™</sup>).

### 4.2 Prosedur Penelitian

#### 4.2.1 Pembuatan media

- a. Pembuatan media Alkaline Pepton Water (APW).

Media Alkaline Pepton Water (APW) dibuat dengan cara melarutkan 10 g pepton dan 10 g NaCl dalam 1 ltr aquadest, diaduk sampai terbentuk massa yang homogen, lalu dimasukkan 225 ml ke dalam erlenmeyer.

- b. Pembuatan media CHROMagar Vibrio (CHROMagar<sup>™</sup>).

Media ditimbang 74,7 g, lalu dilarutkan dalam 1 ltr aquadest steril dalam erlenmeyer steril, dipanaskan hingga terbentuk suatu massa yang homogen, dididihkan 1 – 2 menit, tuang pada cawan petri sebanyak 15 ml tanpa disterilisasi.

- c. Pembuatan media Luria Burtani (LB) broth.

Media Luria Burtani dibuat dengan cara melarutkan 5 g yeast ekstrak, 30 g NaCl dan 10 g tripton dalam 1 ltr aquadest, lalu dipanaskan sampai terbentuk massa yang homogen, masukkan 5 ml ke dalam vial, lakukan sterilisasi dalam autoklaf

- d. Pembuatan media Thiosulfat Citrate Bile Sucrose Agar (Eiken<sup>®</sup>).

Media ditimbang 88 g lalu dilarutkan dalam 1 ltr aquadest steril pada erlenmeyer steril, dipanaskan sampai terbentuk massa yang homogen, cek



pH  $8,6 \pm 0,2$  pada suhu  $25^{\circ}\text{C}$ , lalu dituang pada cawan petri sebanyak 15 ml tanpa sterilisasi.

#### 4.2.2 Isolasi bakteri *Vibrio parahaemolyticus*

Sebanyak 25 ml sampel dimasukkan ke dalam erlenmeyer steril yang berisi 225 ml media Alkaline Pepton Water (APW), tutup dengan kapas lalu dihomogenkan, kemudian diinkubasi dalam *Rotary Shaker Inkubator* selama 6-8 jam.

Setelah diinkubasi sampel diinokulasikan pada cawan petri yang berisi media Thiosulfat Citrate Bile Sucrose (TCBS) Agar (Eiken<sup>®</sup>) dengan metoda *streak*, inkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 18-24 jam, koloni yang diduga *V. parahaemolyticus* (koloni berwarna hijau kebiruan dengan ukuran 1-2 mm) ditanam pada media CHROMagar Vibrio (CHROMagar<sup>™</sup>), lalu inkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 18-24 jam, timbulnya koloni berwarna ungu menandakan koloni dari *V. parahaemolyticus*. Lalu koloni tersebut dipindahkan ke media Luria Burtani (LB) broth dan diinkubasi pada *Rotary shaker* inkubator (150 rpm) pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam. Biakan murni ini kemudian digunakan untuk identifikasi *Vibrio parahaemolyticus* secara PCR.

#### 4.2.3 Isolasi bakteri *Vibrio parahaemolyticus*

Sebanyak 25 ml feses cair dimasukkan ke dalam erlenmeyer steril yang berisi 225 ml media Alkaline Pepton Water (APW), tutup dengan kapas penutup steril lalu dihomogenkan, diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 8 jam.

Selanjutnya sampel diinokulasikan pada cawan petri yang berisi media TCBS, inkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam. Koloni yang diduga *Vibrio parahaemolyticus* (berwarna hijau kebiruan dengan diameter 1 - 2 mm) ditanamkan pada media CHROMagar Vibrio. Inkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 48 jam, timbulnya koloni berwarna ungu menandakan koloni dari *V. parahaemolyticus*. Koloni itu dipindahkan ke media Luria Burtani (LB) broth dan diinkubasi didalam *rotary incubator shaker* pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  kecepatan 120 rpm selama 24 jam.

Biakan ini dipindahkan sebanyak 1,5 ml kedalam eppendorf, sel bakteri dijadikan pellet dengan mensentrifus pada 5000 rpm selama 4 menit, larutan supernatan dibuang, ditambahkan lagi 1,5 ml biakan bakteri dalam LB broth dan disentrifugasi lagi pada 5000 rpm selama 4 menit, buang supernatan. Pellet sel yang ada disuspensikan kembali ke dalam 850  $\mu$ l LB broth baru, divorteks kemudian ditambahkan 150  $\mu$ l gliserol steril, divorteks dan disimpan pada suhu 37  $^{\circ}$ C.

#### 4.2.4 Identifikasi *Vibrio parahaemolyticus* secara PCR

##### a. Ekstraksi Genom DNA

Genom DNA diekstraksi dari kultur *Vibrio parahaemolyticus* yang telah ditumbuhkan pada media LB Broth yang diinkubasi pada suhu 37 $^{\circ}$ C. Ekstraksi genom DNA dilakukan dengan metoda Boil Cell Extraction (BCE). Sejumlah 1 ml kultur media dipindahkan ke dalam tabung eppendorf, lalu disentrifus pada 10.000 rpm selama 5 menit, supernatan dibuang, endapan disuspensikan dalam 1 ml aquadest steril lalu divorteks. Panaskan dalam air mendidih selama 10 menit. Selanjutnya diinkubasi 10 menit dalam lemari pendingin dengan suhu -20 $^{\circ}$ C kemudian disentrifus pada 10.000 rpm selama 5 menit, supernatan dipindahkan ke dalam eppendorf baru.

##### b. Penyiapan sampel dan pengaturan program mesin PCR

**Tabel 1.** Komponen-komponen yang diperlukan pada metoda PCR

Pereaksi	Jumlah Pereaksi ( $\mu$ l)
Aquadest steril	11,1
10 x PCR Buffer	2
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,6
Primer 1	0,8
Primer 2	0,8
10 mM dNTPS (Deoksi Nukleotida Trifosfat)	1,6
Taq Polymerase	0,1
DNA Template (Genom DNA)	2
Volume Total	20



Keterangan:

Primer 1:

- a. untuk *toxR*: 5'-GTCTTCTGACGCAATCGTTG-3'
- b. untuk *tdh* : 5'-CCACTACCACTCTCATATGC-3'
- c. untuk *trh* : 5'-GGCTCAAATGGTTAAGCG-3'

Primer 2:

- a. untuk *toxR*: 5'-ATACGAGTGGTTGCTGTCATG-3'
- b. untuk *tdh* : 5'-GGCATCAAATGGCTGATACT-3'
- c. untuk *trh* : 5'-CATTCCGCTCTCATATGC-3'

Masukkan tiap – tiap komponen kedalam eppendorf yang berisi genom DNA, homogenkan dan masukkan ke mesin PCR yang telah dibuat program kerjanya.

**Tabel II.** Program mesin PCR untuk gen *toxR* (20 siklus):

Tahapan Dalam Siklus	Temperatur / Waktu
Pradenaturasi	96 <sup>o</sup> C (5 menit)
Denaturasi	94 <sup>o</sup> C (1 menit)
Annealing (Pengikatan)	63 <sup>o</sup> C (1,5 menit)
Extension (Pemanjangan)	72 <sup>o</sup> C (1,5 menit)
Elongation (Pemanjangan akhir)	72 <sup>o</sup> C (7 menit)

**Tabel III.** Program mesin PCR untuk gen *tdh* dan *trh* (35 siklus):

Tahapan Dalam Siklus	Temperatur / Waktu
Pradenaturasi	96 <sup>o</sup> C (5 menit)
Denaturasi	94 <sup>o</sup> C (1 menit)
Annealing (Pengikatan)	55 <sup>o</sup> C (1 menit)
Extension (Pemanjangan)	72 <sup>o</sup> C (1 menit)
Elongation (Pemanjangan akhir)	72 <sup>o</sup> C (7 menit)

### c. Elektroforesa

Elektroforesa dilakukan pada gel agarosa 1.2% menggunakan TBE 1x pada tegangan 150 Volt selama 5 menit, kemudian dilanjutkan pada tegangan 80 Volt selama 50 menit. Selanjutnya gel diwarnai dengan 0.5 µg/ml larutan editium bromida selama 5-10 menit dan dilihat gambarannya di bawah alat pengamat DNA (Gel Doc). Gel tersebut diphoto dengan menggunakan film Polaroid. Pada

photo dapat dilihat pola pemisahan pita-pita DNA yang ukurannya diketahui melalui perbandingan dengan ukuran pita-pita standar 1 Kb *DNA ladder*, dimana ukuran pita-pita DNA *Vibrio parahaemolyticus* untuk *toxR* adalah 368 bp, untuk *tdh* adalah 251 bp dan untuk *trh* adalah 250 bp.

## V. HASIL DAN PEMBAHASAN

Setelah dilakukan isolasi bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dari tiga jenis kerang kerangan yang banyak di jumpai di Sumatera Barat dan biasa dikonsumsi sebagai lauk atau makanan kecil, yaitu dari species *Corbicula molukiana* (pensi), *Batissa violaceae* (lokan) dan *Fanus ater* (langkitang) dari tiga pedagang dengan masing-masing tiga kali pengambilan sampel, dimana isolasi *Vibrio parahaemolyticus*, maka didapat kultur murni *Vibrio parahaemolyticus* yang tumbuh pada medium TCBS Agar dengan koloni berwarna hijau, dan pada medium CHROM agar Vibrio, ditunjukkan oleh koloni berwarna ungu tunggal. Hasil isolasi dapat dilihat pada lampiran 2 tabel II.

Sampel uji lain berasal dari pembuangan rumah sakit. Dipilih rumah sakit sebagai lokasi pengambilan sampel karena di tempat inilah kemungkinan terbesar diperoleh organisme virulen yang menimbulkan penyakit bagi manusia. Disamping itu, pada saluran pembuangan air limbah di rumah sakit tersebut terdapat banyak mikroorganisme patogen, salah satunya adalah bakteri dari genus vibrio yang sangat mudah menyebar melalui air.

*V. parahaemolyticus* diisolasi dari 3 titik pembuangan limbah cair pada 5 rumah sakit di kota Padang, Sumatra Barat. Dari kelima rumah sakit tersebut semuanya berhasil diisolasi *V. parahaemolyticus*. Hasil isolasi dapat dilihat pada lampiran 2 tabel II.

Pengambilan sampel yang berupa feses pasien penderita diare dilakukan satu kali dalam seminggu selama 4 bulan. Pada penelitian ini sampel diambil dari penderita diare yang masih balita dan dewasa karena pada umumnya infeksi oleh bakteri *Vibrio parahaemolyticus* disebabkan karena mengkonsumsi makanan laut yang terkontaminasi oleh bakteri ini. Hal ini bisa terjadi pada semua golongan usia baik pria maupun wanita. Sampel di masukkan kedalam pot salep yang telah



disterilisasi dengan menggunakan alkohol dan selanjutnya dilakukan metoda isolasi yang biasa digunakan oleh FDA (Food and Drug Administration) dalam pengisolasian sampel klinis.

Gen *toxR* adalah gen yang ikut berperan dalam sintesa toksin pada bakteri tertentu, khususnya pada spesies dari genus *Vibrio*. Gen ini pertama kali ditemukan pada bakteri *Vibrio cholerae* tetapi kemudian ditemukan juga pada beberapa spesies bakteri lainnya dari genus *Vibrio*, antara lain *Vibrio vulnificus* dan *Vibrio parahaemolyticus*. Susunan basa nukleotida dari gen *toxR* yang terdapat pada *V. cholerae* berbeda dengan gen *toxR* yang terdapat pada *V. parahaemolyticus*. Gen *Vp-toxR* ini merupakan gen spesifik yang terdapat pada spesies bakteri *V. parahaemolyticus*. Metoda PCR digunakan untuk mendeteksi gen *Vp-toxR* sebagai konfirmasi dari bakteri *V. parahaemolyticus*.

Proses yang terjadi pada mesin PCR adalah denaturasi DNA dengan suhu yang tinggi ( $94^{\circ}\text{C}$ ) sehingga rantai DNA yang berupa rantai ganda yang berpilin menjadi helaian tunggal yang terputus-putus. Gen target terputus menjadi dua buah helaian tunggal yaitu rantai basa nukleotida 1 dan rantai basa nukleotida 2. Rantai basa nukleotida 1 diikat oleh *primer* 1 dari arah 3' (tiga aksen) ke 5' (lima aksen) dan rantai basa nukleotida 2 diikat oleh *primer* 2 dari arah 3' ke 5' juga. Dengan adanya enzim *Taq Polymerase*,  $\text{MgCl}_2$  sebagai kofaktor, dan dNTP's (d-ATP, d-CTP, d-GTP, d-TTP) sebagai suplai nukleotida, primer yang tersusun dari kurang lebih 13 basa nukleotida akan diperpanjang sehingga jumlahnya sama dengan rantai basa nukleotida 1 dan 2 membentuk dua buah gen yang sempurna. Proses ini berlangsung pada satu kali siklus, apabila terdapat 20 siklus maka gen yang terbentuk adalah  $2^{20} = 1048576$  atau dirumuskan  $2^n$  ( $n$ =jumlah siklus). Setelah proses menggunakan mesin PCR selesai, dilakukan elektroforesa gel untuk melihat pola pemisahan pita DNA.

Sebanyak 14 kultur yang positif dari sampel klinis memiliki gen *toxR* dilakukan deteksi gen *tdh* dan *trh*. Kedua gen yang terdapat pada *Vibrio parahaemolyticus* ini berperan dalam sintesa enterotoksin TDH dan TRH yang dapat menyebabkan peningkatan sekresi cairan intestinal. Dengan menggunakan

primer-primer yang spesifik, kedua gen ini dapat dideteksi dengan menggunakan metoda PCR untuk melihat patogenitas dari *V. parahaemolyticus*. Dari hasil yang diperoleh yaitu 2 kultur positif memiliki gen *tdh* dan tak ada satupun kultur yang memiliki gen *trh*. Dari hasil ini terlihat bahwa bakteri *V. parahaemolyticus* hasil isolasi ini hanya dua kultur yang bersifat virulen. Hal ini bisa disebabkan karena penyakit diare yang diderita pasien diakibatkan oleh infeksi bakteri dari spesies lain.

## VI. KESIMPULAN

Dari penelitian yang dilakukan dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Isolasi *Vibrio parahaemolyticus* dari species *Corbicula moltkiana* (pensi), *Batissa violacae* (lokan) *Faunus ater* (langkitang) yang mentah dan telah dimasak diperoleh hasil bahwa 34% sample makanan di kontaminasi oleh *Vibrio parahaemolyticus*.
2. Dari dua puluh kultur murni setiap sample uji telah diidentifikasi gen *toxR* dengan metoda Polymerase Chain Reaction (PCR), diperoleh hasil bahwa 17 kultur dari *Corbicula moltkiana* yang telah dimasak dan 12 kultur dari yang mentah, 4 kultur dari *Batissa violacae* yang telah dimasak dan 8 kultur dari yang mentah, 7 kultur dari *Faunus ater* yang telah dimasak dan 5 kultur dari yang mentah, 13 kultur dari limbah rumah sakit, 12 kultur dari air laut, 9 kultur dari feses pasien balita dan 13 kultur dari feses pasien dewasa positif gen *toxR*.
3. Dari sample uji feses, dilakukan identifikasi gen *tdh* dan gen *trh*, diperoleh hasil bahwa 2 dari 17 kultur murni positif mempunyai gen *tdh* dan semua kultur negative gen *trh*.



## DAFTAR PUSTAKA

1. Kim, Y. B., J. Okuda, C. Matsumoto, N. Takahashi, S. Hashimoto, and M. Nishibuchi, "Identification of *Vibrio parahaemolyticus* Strains at the Species Level by PCR Targeted to the *toxR* Gene", *Journal of Clinical Microbiology*, **37**, 1999, 1173-1177
2. Provenzano, D., D. A. Scuhmacher, J. L. Barker, and K. E. Klose, "The Virulence Regulatory Protein *ToxR* Mediates Enhanced Bile Resistance in *Vibrio Cholerae* and Other Pathogenic *Vibrio* Species", *Journal of Clinical Microbiology*, **12**, 1999, 7758-7763
3. Cordova, J. L., J. Astorga, W. Silva, and C. Riquelme, "Characterization by PCR of *Vibrio parahaemolyticus* isolates collected during the 1997-1998 Chilean outbreak", *Biological Research*, **35**, 2002, 433-440
4. Hara-Kudo, Y., K. Sugiyama, M. Nishibuchi, A. Chowdury, J. Yatsuyanagi, Y. Ohtomo, A. Saito, H. Nagano, T. Nishina, H. Nakagawa, H. Konuma, M. Miyahara, and S. Kumagai, "Prevalence of Pandemic Thermostable Direct Hemolysin Producing *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in Seafood and the Coastal Environment in Japan", *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 2003, 2685-2689
5. Vuddhakul, V., A. Chowdury, V. Laohaprerthisan, P. Pungrasamee, N. Patararungrong, P. Thianmontri, M. Ishibashi, C. Matsumoto, and M. Nishibuchi, "Isolation of a Pandemic O3:K6 Clone of a *Vibrio parahaemolyticus* Strain from Environmental and Clinical Sources in Thailand", *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 2002, 2685-2689
6. Tada, J., T. Ohashi, N. Nishimura, Y. Shirasaki, H. Ozaki, S. Fukushima, J. Takano, M. Nishibuchi, and Y. Takeda, "Detection of The Thermostable direct hemolysin gene (*tdh*) and The Thermostable direct hemolysin-Related Hemolysin gene (*trh*) of *Vibrio parahaemolyticus* by Polymerase Chain Reaction", *Applied and Environmental Microbiology*, **32**, 1992, 604-606
7. Uji Resistensi *Vibrio cholerae* Yang Diisolasi Dari Feses Balita Diare Terhadap Beberapa Antibiotika, Skripsi Sarjana Farmasi, FMIPA, Universitas Andalas, Padang, 2004
8. Merck., "TCBS Agar: *Vibrio* Selective Agar", <http://.Service.merck.de/microbiology/iedisdata/product>, 2003.
9. CHROMagar<sup>TM</sup>., "CHROMagar *Vibrio*", <http://www.Chromagar.com/products/vibrio>, 2003.