

DETEKSI GEN-GEN PENYANDI FAKTOR VIRULENSI PADA BAKTERI VIBRIO

Ince Ayu Khairani Kadriah^{*)}, Endang Susianingsih^{*)}, Sukenda^{**)},
Munti Yuhana^{**)}, dan Enang Harris^{**)}

^{*)} Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau
Jl. Makmur Daeng Sitakka No. 129, Maros 90512, Sulawesi Selatan
E-mail: *e_sisy@yahoo.com*

^{**)} Departemen Budidaya Perairan-FPIK, Institut Pertanian Bogor
Jl. Lingkar Akademik, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

(Naskah diterima: 21 Januari 2011; Disetujui publikasi: 5 April 2011)

ABSTRAK

Penelitian untuk mendeteksi gen-gen penyandi virulensi dilakukan dengan menggunakan isolat bakteri yang diisolasi dari budidaya udang windu di berbagai daerah di Sulawesi Selatan dan Jawa. Pada penelitian ini digunakan primer spesifik untuk mendeteksi gen-gen virulen *toxR gene*, hemolysin (*vvh gene*), dan *GyrB gene* dengan metode PCR. Dari 35 isolat yang diisolasi, 20 isolat terdeteksi memiliki gen virulensi dan 8 di antaranya memiliki dua gen virulen. Spesies bakteri yang memiliki gen virulen adalah: *V.harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus*, dan *V. campbelli*.

KATA KUNCI: vibrio, faktor virulen, primer spesifik

ABSTRACT: *Detection of vibrio virulence factor genes. By: Ince Ayu Khairani Kadriah, Endang Susianingsih, Sukenda, Munti Yuhana, and Enang Harris*

*Research to identify genes which encodes virulence factors involved in pathogenicity to tiger shrimp was done using bacteria isolates from South Sulawesi dan Jawa. Of 35 bacteria isolates, 20 isolates were detected to have virulence genes of which 8 of them have virulent genes. Three pairs of the specific primer set (*toxR gene*, hemolysin (*vvh gene*) and *GyrB gene*), could amplify the expected gene fragment in PCR using templates from all 20 studied bacteria isolates. Genes which encodes a virulence factor were detected from *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus*, and *V. campbelli*.*

KEYWORDS: *vibrio, virulence factor, specific primer*

PENDAHULUAN

Di antara beberapa bakteri patogen, spesies vibrio sudah dikenal sebagai penyebab penyakit vibriosis pada udang penaeid. Bakteri vibrio adalah salah satu penyebab penyakit yang cukup banyak menyerang hewan budidaya seperti udang windu (Karunasagar *et al.*, 1994), beberapa spesies ikan dan kekerangan (Austin & Zhang,

2006) bahkan juga karang (Ben-Haim *et al.*, 2003). Beberapa spesies Vibrio berpendar seperti *Vibrio cholerae* (biotype *albansis*), *V. fischeri*, *V. harveyi*, *V. logei*, *V. splendidus*, *V. mediterranei* (Farmer & Hickman-Brenner, 1992), *V. orientalis* (Yang *et al.*, 1983), *Photobacterium leiognathi* dan *P. Phosphoreum* diketahui berhubungan erat dengan beberapa kejadian penyakit pada pembenihan dan pembesaran hewan budidaya. Pada banyak

kejadian penyakit pada budidaya udang windu, *V. harveyi* selalu ditemukan (Lavilla-Pitogo *et al.*, 1990, 1998; Karunasagar *et al.*, 1994; Austin & Zhang, 2006; Cano-Gomez, 2009).

Kejadian penyakit di lapangan selalu ditandai dengan terjadinya fenomena udang dan air bercahaya (*bioluminescence*). Selain itu, udang juga terlihat lemah dalam pergerakannya dan mengalami nekrosis (Karunasagar, 1994). Leano (1998) menyatakan bahwa pada saat udang telah mengalami gejala-gejala klinis seperti yang disebutkan maka konsentrasi bakteri vibrio pada hepatopankreas sudah mencapai kepadatan 10^5 - 10^6 CFU/mL. Kepadatan di atas atau sama dengan 10^5 CFU/mL menurut Leano (1998), kepadatan yang cukup untuk menjadikan bakteri vibrio bersifat patogen di alam. Hal inilah yang menjadi alasan sulitnya untuk melakukan upaya pencegahan penyakit jika berdasarkan munculnya gejala klinis di lapangan karena kepadatan bakteri sudah tinggi.

Adanya metode deteksi dini yang menggunakan penanda spesifik dapat dengan cepat mendeteksi adanya kontaminasi bakteri *Vibrio harveyi* akan sangat membantu dalam penanganan dan pencegahan awal yang tepat waktu untuk mengurangi kematian udang. Disebabkan begitu dekatnya kekerabatan antara *V. harveyi* dengan beberapa spesies vibrio lain seperti *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. Campbellii*, dan *V. carchariae* (Kita-Tsukamoto *et al.*, 1993), maka identifikasi *V. harveyi* dengan metode biokimia tidak akurat lagi (Conejero & Hedreyda, 2004). Oleh karena itu, metode PCR yang dapat menunjukkan sekuen nukleotida secara spesifik untuk satu jenis spesies bakteri dapat menjadi metode deteksi yang lebih akurat dan cepat.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendeteksi keberadaan gen spesifik dari bakteri *Vibrio* sp. untuk selanjutnya akan digunakan sebagai penanda molekuler dalam diagnosis cepat penyakit vibriosis berpendar (kunang-kunang) pada budidaya udang. Gen spesifik yang akan dideteksi pada penelitian ini adalah gen *toxR* (Pang *et al.*, 2005), gene *Vhh* hemolysin (Conejero & Hedreyda, 2004), dan gene *GyrB* (Thaithongnum *et al.*, 2006).

Hasil dari penelitian ini selanjutnya diharapkan dapat menjadi acuan untuk pembuatan penanda molekuler spesifik yang akan digunakan dalam deteksi dini serangan penyakit vibriosis pada budidaya udang

windu. Metode deteksi ini dapat digunakan untuk studi epidemiologi dan *monitoring* kejadian penyakit sehingga dapat dilakukan tindakan pencegahan yang tepat waktu dan tepat sasaran untuk menekan perkembangan bakteri *V. harveyi* virulen dalam media budidaya.

METODOLOGI

Isolasi dan Identifikasi Bakteri *Vibrio* dari Tambak Udang

Sebelum dilakukan uji karakterisasi morfologi dan fisiologi bakteri, terlebih dahulu dilakukan isolasi koloni bakteri berpendar dari kejadian penyakit di tambak udang. Sebanyak 35 isolat bakteri diisolasi dari berbagai daerah di Sulawesi (Maros, Takalar, dan Pinrang) dan Jawa (Banyuwangi, Negara, dan Gondol-Bali) (Tabel 1). Bakteri diisolasi dari air tambak, sedimen tambak dan udang sakit. Sampel air diambil dengan menggunakan botol steril kemudian dibawa ke laboratorium. Sedangkan sampel sedimen diambil menggunakan sudip steril dan dibawa ke laboratorium menggunakan botol steril. Isolasi bakteri dilakukan dengan cara mengambil 1 mL air sampel dan 1 g sedimen tambak kemudian diencerkan secara bertingkat dalam larutan fisiologis (Benson, 1985) dan dikultur pada media TCBSA (*Thiosulfat Citrate Bile Sucrose Agar*) (Difco; 89 gr/L) pada suhu 28°C.

Seleksi awal isolat bakteri dilakukan berdasarkan pertumbuhan dan kemampuan pendarannya. Isolat terpilih kemudian diuji karakterisasi dan morfologinya untuk identifikasi spesies menggunakan uji biokimia. Uji biokimia ini dilakukan berdasarkan metode yang dilakukan oleh Austin (1991); Austin & Austin (1993); Alsina & Blanch (1994); Baumann *et al.* (1994); Muir (1996a). Untuk menentukan spesies dari bakteri vibrio, data hasil uji biokimia yang diperoleh diolah dengan menggunakan perangkat lunak *Fortran Computer Program* (Muir, 1996b). Dari hasil uji biokimia diperoleh beberapa spesies bakteri vibrio (Tabel 1). Isolat bakteri *Vibrio harveyi* yang diperoleh diremajakan secara berkala dengan menumbuhkannya pada media agar TCBS. Selanjutnya bakteri hasil isolasi diuji patogenisitasnya. Uji patogenisitas ini dimaksudkan untuk mendapatkan kandidat isolat bakteri yang berpotensi memiliki gen virulen. Gen virulen yang teridentifikasi selanjutnya akan digunakan sebagai penanda molekuler dalam deteksi cepat.

Tabel 1. Isolat bakteri yang digunakan dalam penelitian
 Table 1. *Bacteria isolates used in the study*

Kode bakteri <i>Bacteria code</i>	Asal <i>Source</i>	Spesies <i>Species</i>
1	Banyuwangi	<i>V. harveyi</i>
2	Negara-Bali	<i>Vibrio sp</i>
3	Gondol-Bali	<i>V. parahaemolyticus</i>
109	Maros	<i>V. campbelli</i>
110	Maros	<i>V. harveyi</i>
111	Maros	<i>V. harveyi</i>
112	Maros	<i>V. harveyi</i>
114	Maros	<i>V. harveyi</i>
115	Maros	<i>V. harveyi</i>
116	Maros	<i>V. mimicus</i>
119	Maros	<i>V. mimicus</i>
120	Maros	<i>V. harveyi</i>
128	Maros	<i>V. harveyi</i>
130	Maros	<i>V. harveyi</i>
133	Maros	<i>V. harveyi</i>
137	Maros	<i>V. harveyi</i>
139	Maros	<i>V. harveyi</i>
144	Maros	<i>V. harveyi</i>
145	Maros	<i>V. harveyi</i>
154	Maros	<i>V. mimicus</i>
159	Maros	<i>V. harveyi</i>
671	Maros	<i>V. mimicus</i>
672	Maros	<i>V. mimicus/harveyi</i>
673	Maros	<i>V. harveyi</i>
675	Maros	<i>V. harveyi</i>
676	Maros	<i>V. harveyi</i>
5575	Maros	<i>V. campbelli</i>
5582	Maros	<i>V. harveyi</i>
5584	Maros	<i>V. mimicus/harveyi</i>
5585	Maros	<i>V. mimicus/harveyi</i>
168	Takalar	<i>V. harveyi</i>
170	Takalar	<i>V. harveyi</i>
173	Takalar	<i>V. harveyi</i>
275	Pinrang	<i>V. harveyi</i>
276	Pinrang	<i>V. metschnikovi</i>

Isolasi Genom Bakteri Kandidat

Metode yang digunakan dalam isolasi genom bakteri adalah metode phenol-chloroform. Bakteri dikultur di dalam *Nutrient broth* selama 4 jam kemudian dipanen dengan cara sentrifugasi. Sebanyak 1 mL biakan bakteri dipindahkan ke dalam tabung eppendorf steril 1,5 mL dan disentrifugasi (6.000 rpm; 10 menit).

Proses sentrifugasi diulang sebanyak dua kali dan kemudian dilakukan pencucian dengan larutan fisiologis juga dengan sentrifugasi. Pelet bakteri yang dihasilkan kurang lebih 50 mg kemudian dicampur dengan 500 µL *lysis buffer*, 20 µL proteinase-K (stok 20 mg/mL) dan 40 µL *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) 10%. Setelah itu biakan bakteri diinkubasi dalam *waterbath* selama 1–3 jam pada suhu 55°C.

Penambahan 12.5 µL RNase dilakukan sebelum biakan disimpan pada suhu ruang selama 15-30 menit. Selanjutnya ditambahkan Phenol:Chloroform:Isoamyl alcohol (PCIA 25:24:1) sebanyak 500 µL. Tabung eppendorf divortex secara perlahan sampai homogen dan disimpan pada suhu ruang selama 10 menit. Selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 8 menit. Lapisan paling atas diambil dan dipindahkan ke tabung eppendorf baru dan dilakukan penambahan PCIA seperti sebelumnya. Setelah lapisan paling atas dipindahkan ke tabung eppendorf baru, dilakukan penambahan satu bagian larutan Chloroform: Isoamyl alcohol (CIA 24:1) dan disentrifugasi selama 4 menit dengan kecepatan 13.000 rpm. Lapisan paling atas dipindahkan ke tabung eppendorf baru dan ditambahkan dua bagian ethanol absolut dingin kemudian dicampur perlahan sampai homogen. Dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 6.000 rpm selama 30 menit. Cairan dibuang kemudian pellet DNA dicuci dengan 1 mL ethanol 70% kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 6.000 rpm selama 15 menit. Pellet DNA dikeringkan selama satu malam dan setelah kering ditambahkan 100 µL Buffer Tris-Etilen DiaminTetra Aceticacid (EDTA) (TE) dan selanjutnya disimpan pada suhu -20°C sampai digunakan.

Proses PCR

Setelah genom bakteri berhasil diisolasi (Gambar 1), proses selanjutnya adalah deteksi gen spesifik pada isolat yang kita miliki. Deteksi gen spesifik ini dilakukan dengan melakukan amplifikasi DNA menggunakan mesin thermocycler yang lebih dikenal dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

Proses PCR untuk memperbanyak DNA melibatkan serangkaian siklus temperatur yang berulang dan masing-masing siklus terdiri atas tiga tahapan. Tahapan yang pertama adalah denaturasi cetakan DNA (*DNA template*) pada temperatur 94°C-96°C, yaitu pemisahan utas ganda DNA menjadi dua utas tunggal. Sesudah itu, dilakukan penurunan temperatur pada tahap kedua sampai 45°C-60°C yang memungkinkan terjadinya penempelan (*annealing*) atau hibridisasi antara oligonukleotida primer dengan utas tunggal cetakan DNA. Tahap yang terakhir adalah tahap ekstensi atau elongasi (*elongation*), yaitu pemanjangan primer menjadi suatu utas DNA baru oleh enzim DNA

polimerase. Temperatur pada tahap ini bergantung pada jenis DNA polimerase yang digunakan. Proses PCR dilakukan menggunakan *Ready To Go* (RTG) dengan primer spesifik *V. harveyi* yang sudah ada (Tabel 2) dan dilakukan optimasi pada beberapa tingkatan suhu *annealing*.

Terdapat perbedaan pada proses amplifikasi DNA untuk setiap primer spesifik yang digunakan. Proses amplifikasi DNA untuk primer *toxR* adalah sebagai berikut: Larutan master mix dibuat dengan mencampur 20 µL *aquadest milliQ* ke dalam 1 tube RTG (GE Healthcare UK Limited Little Chalfont Buckinghamshire, UK), kemudian ditambahkan masing-masing 1 µL Primer *toxR* dan *toxRF1*. Setelah larutan dihomogenkan selanjutnya dimasukkan template DNA sebanyak 3 µL. Kondisi proses amplifikasi untuk primer spesifik *toxR* diatur sebanyak 30 siklus pada suhu denaturasi 94°C selama 1 menit, *annealing* 57°C selama 1 menit dan elongasi 72°C selama 1 menit serta tahap ekstra elongasi 72°C selama 10 menit pada mesin PCR (Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler). Selanjutnya sebanyak 3 µL produk PCR diambil untuk proses elektroforesis dalam 1% (w/v) gel agarose. Proses amplifikasi DNA untuk primer spesifik *vvh* gen (*hemolysin*) diatur sebanyak 30 siklus pada suhu denaturasi 94°C selama 1 menit, *annealing* 53°C selama 1 menit dan elongasi 72°C selama 1 menit (Conejero & Hedreya, 2004). Sedangkan untuk amplifikasi gen *gyrB* proses PCR juga diatur sebanyak 30 siklus dengan suhu denaturasi 94°C selama 1 menit, *annealing* 60°C selama 1 menit dan elongasi 72°C selama 2 menit serta tahap ekstra elongasi 72°C selama 7 menit (Thaithongnum *et al.*, 2006).

Elektroforesis

Hasil PCR kemudian akan diaplikasikan pada gel agarosa untuk diobservasi dan didokumentasikan. Elektroforesis minigel hanya optimum untuk pemisahan DNA berukuran kecil (ratusan bp hingga sekitar 10 kb). Kondisi running pada minigel: Voltase 70 hingga 120 V, waktu *running*: 30 hingga 120 menit. Kondisi kuat arus (Ampere) akan menyesuaikan *setting* Voltase sehingga tidak perlu di-*setting* lagi. Buffer elektroforesis diperlukan untuk menciptakan kondisi bermuatan listrik. Pada umumnya berupa buffer Tris Aceticacid EDTA (TAE) atau Tris Boric EDTA (TBE).

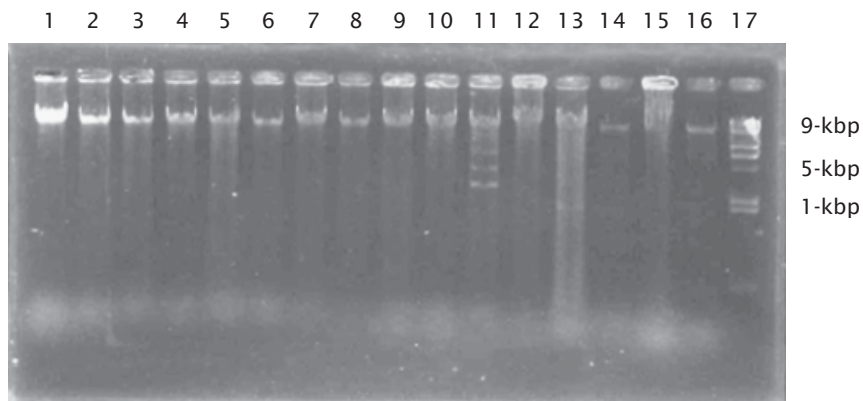
HASIL DAN BAHASAN

Hasil isolasi genom menunjukkan semua bakteri berhasil diisolasi genomnya dengan baik (Gambar 1). Hasil PCR yang diperoleh menggunakan primer spesifik *GyrB*, menunjukkan bahwa gen spesifik *GyrB* dapat dideteksi pada isolat : 5582; 5584; 109; 120; 5585; 154; 159; 672; 676; 128; 133; 137; dan 139 (Gambar 2a dan 2b). Gen ini dapat digunakan sebagai penanda bakteri berpendar pada panjang basa 363 bp (Thaithongnum *et al.*, 2006). Gen *GyrB* mengkode protein sub-unit B dari DNA gyrase (*topoisomerase* type II). DNA gyrase mengatur superkoiling pita ganda DNA. Gen *gyrB* sangat diperlukan untuk replikasi DNA di mana gen ini berperan dalam pembentukan protein yang mengkode enzim *Gyrase*. Enzim ini terdistribusi pada hampir semua spesies dalam genus *Vibrio*. Enzim ini yang mengurangi tekanan saat *double-stranded* DNA sedang tidak terikat oleh ikatan helikase hal ini menyebabkan terjadinya superkoiling DNA. Banyak antibiotik bekerja dengan menyerang gyrase. Gyrase DNA bakteri hadir di prokariota dan beberapa eukariota, tetapi enzim ini tidak sepenuhnya mirip dalam struktur atau urutan, dan memiliki kedekatan yang berbeda untuk setiap molekul yang berbeda. Enzim ini tidak ditemukan pada manusia. Hal ini membuat gyrase sebagai

target yang baik untuk antibiotik. Bakteri patogen memiliki struktur gen *Gyr-B* yang spesifik dibandingkan bakteri lainnya (Thaithongnum *et al.*, 2006).

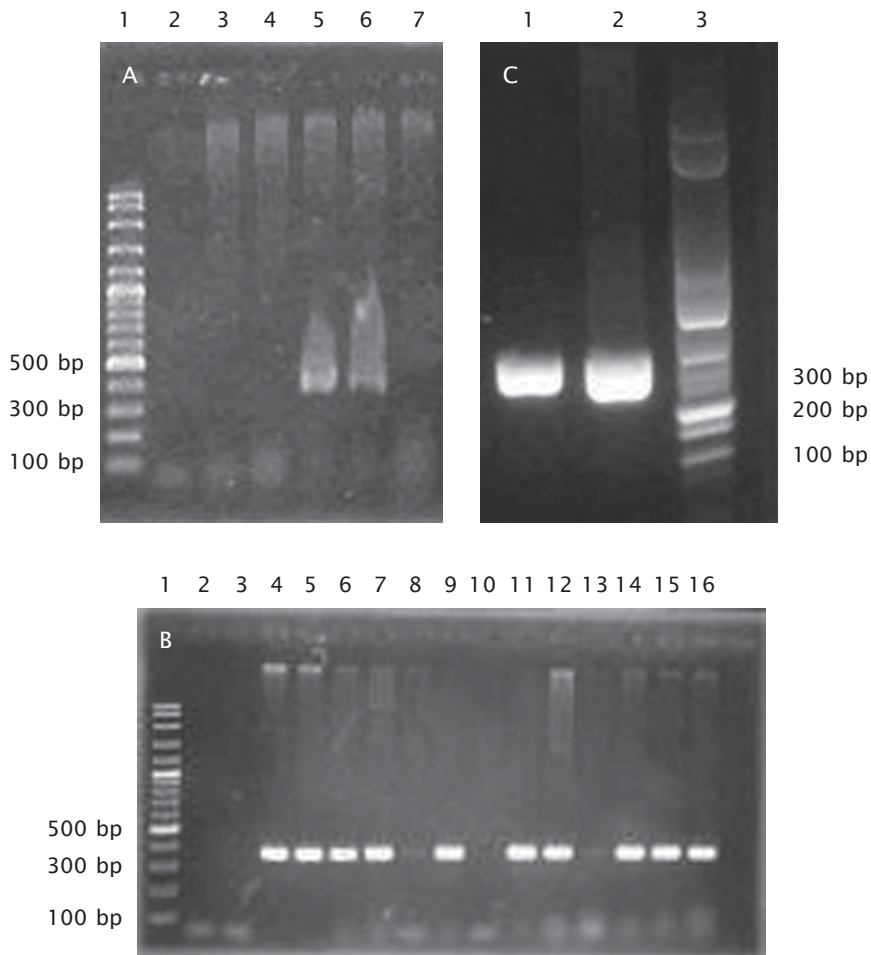
Identifikasi gen hemolysin dengan primer spesifik *vvh* menunjukkan isolat yang teridentifikasi memiliki gen ini adalah: 1, 2, 3, 5582, 5584, 154, 671, 676 (Gambar 3a, 3b, dan 3c). Dari gambar ini terlihat bahwa gen penyandi sifat virulensi dengan menggunakan primer spesifik hemolysin (*vvh*) gen dapat teridentifikasi pada posisi 308 bp. Panjang basa dari hasil PCR ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh Conejero & Hedreyda (2004). Hemolysin adalah eksotoksin yang bertanggung jawab dalam proses penyerapan membrane eritrosit atau proses hemolisis sel darah. Gen yang mengkode hemolysin ini dilaporkan ditemukan pada beberapa spesies bakteri yang termasuk genus *Vibrio* (Conejero & Hedreyda, 2004). Bakteri *Vibrio* patogen yang memiliki gen hemolysin diketahui dapat menyebabkan terjadinya lisis pada sel darah inang.

Identifikasi gen penyandi sifat virulensi juga telah dilakukan dengan menggunakan primer *toxR* dengan suhu annealing 57°C dengan hasil terlihat bahwa isolat No 1, 2, 3, 672, 673, 168, dan 170 terdeteksi memiliki gen *toxR*. Namun gen target yang berhasil



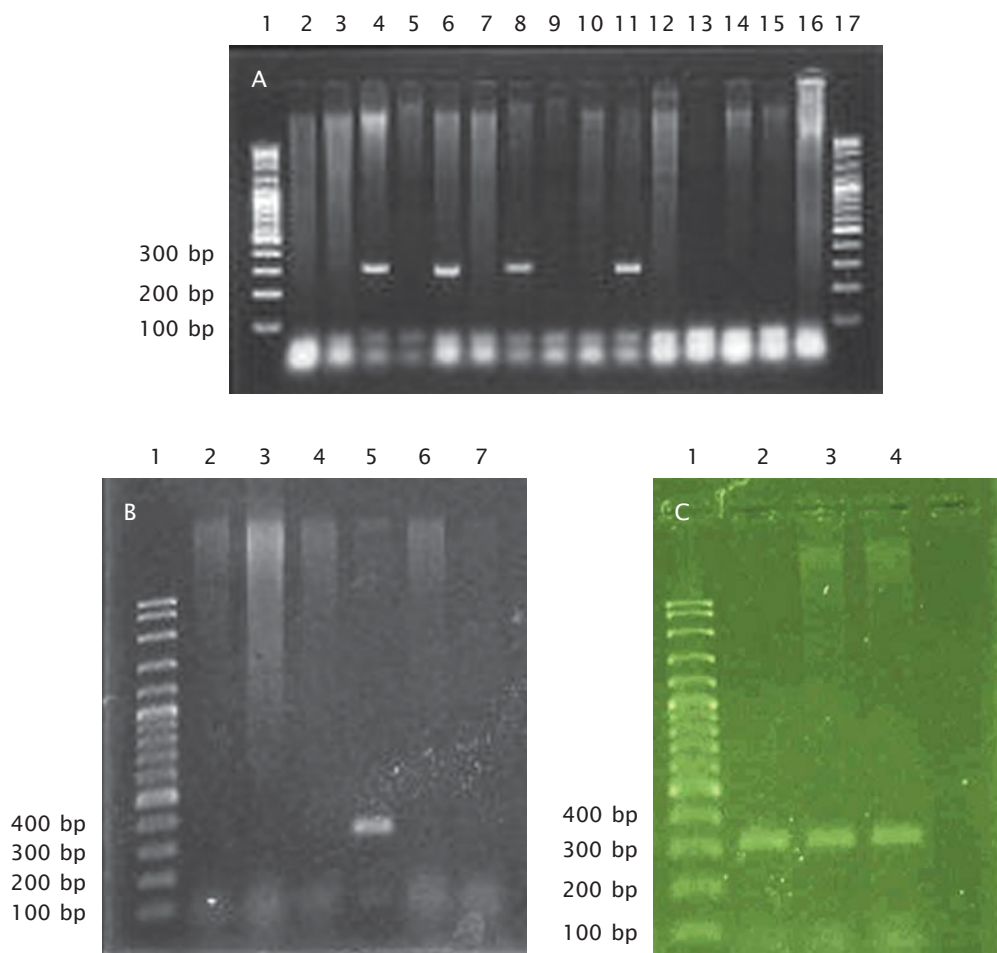
Gambar 1. Hasil isolasi genom dari 16 bakteri uji. Lajur 1-16 masing-masing genom isolat bakteri *Vibrio* spp. kode 109, 110, 111, 112, 114, 115, 116, 119, 120, 128, 130, 133, 137, 139, 144, 145. Lajur 17 adalah 1-kbp DNA Ladder

Figure 1. Bacteria genome extraction profile from 16 *Vibrio* spp. isolates. Lanes 1-16, genome from bacteria isolate number 109, 110, 111, 112, 114, 115, 116, 119, 120, 128, 130, 133, 137, 139, 144, 145 respectively. Lane 17 contains 1-kbp DNA Ladder



Gambar 2a dan 2b. Hasil PCR untuk primer spesifik A2 dan B3 GyrB dan DNA templat dari 23 isolat bakteri *Vibrio* spp. (a) Lajur 2-7 masing-masing templat DNA dari isolat kode 1, 2, 3, 109, 120 dan 168. Lajur 1 adalah 100-bp DNA ladder. (b) Lajur 2-16 masing-masing templat DNA dari isolat kode 110, 111, 5584, 5585, 154, 159, 671, 672, 675, 676, 128, 130, 133, 137 dan 139. Lajur 1 adalah 100-bp DNA ladder. (c) Lajur 1 DNA templat dari isolate kode 275, lajur 2 isolat 276. Lajur 3 adalah 100-bp DNA ladder

Figure 2a and 2b. PCR profiles using GyrB A2 and B3 specific primer and DNA templates from 23 *Vibrio* spp. isolates. (a) Lanes 2-7 DNA templates from isolate 1, 2, 3, 109, 120 and 168 respectively. Lane 1 contains the 100-bp DNA ladder. (b) Lanes 2-16, DNA templates from isolate 110, 111, 5584, 5585, 154, 159, 671, 672, 675, 676, 128, 130, 133, 137 and 139 respectively. Lane 1 contains the 100-bp DNA ladder. (c) Lane 1 and 2 DNA template from isolate 275 and 276 respectively. Lane 3 contains the 100-bp DNA ladder

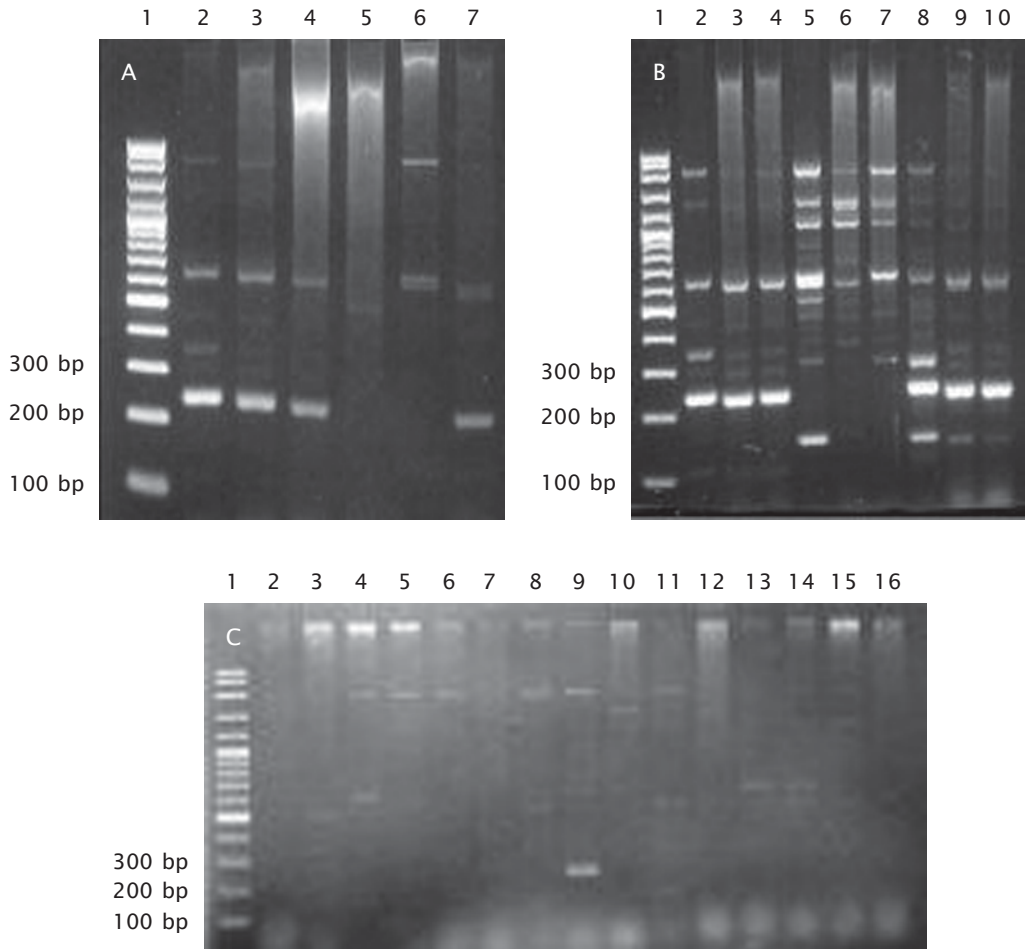


Gambar 3a, 3b, dan 3c.

Hasil PCR untuk primer spesifik VHF1 dan VhhemoR hemolysin gene DNA templat dari 24 isolat bakteri *Vibrio* spp. (a) Lajur 2-16 masing-masing template DNA dari isolate bakteri kode 110, 111, 5584, 5585, 154, 159, 671, 672, 675, 676, 128, 130, 133, 137 dan 139. Lajur 1 dan 17 adalah 100-bp DNA ladder. (b) Lajur 2- 7 masing-masing template DNA dari isolate bakteri kode 109, 275, 276, 120, 5582, 168 dan 170. Lajur 1 adalah 100-bp DNA ladder. (c) Lajur 2-4 masing-masing template DNA dari isolate bakteri kode 1, 2 dan 3. Lajur 1 adalah 100-bp DNA ladder

Figure 3a, 3b, and 3c.

PCR profiles using specific primer VHF1 and VhhemoR hemolysin gene and DNA templates from 24 *Vibrio* spp. isolates. (a) Lanes 2-16 DNA templates from isolate 110, 111, 5584, 5585, 154, 159, 671, 672, 675, 676, 128, 130, 133, 137 and 139 respectively. Lane 1 and 17 contain the 100-bp DNA ladder. (b) Lanes 2-7 DNA templates from isolate 109, 275, 276, 5582, 168 and 170 respectively. Lane 1 contains the 100-bp DNA ladder. (c) Lanes 2-4 DNA templates from isolate 1, 2 and 3 respectively. Lane 1 contains the 100-bp DNA ladder



Gambar 4a, 4b, dan 4c. Hasil PCR untuk primer spesifik *toxRF1* dan *toxRR1* gene DNA templat dari 24 isolat bakteri *Vibrio* spp. (a) Lajur 2-7 masing-masing template DNA dari isolate bakteri kode 1, 2, 3, 111, 5582 dan 168. Lajur 1 adalah 100-bp DNA ladder. (b) Lajur 2-10 masing-masing template DNA dari isolate bakteri kode 1, 2, 3, 5582, 109, 120, 673, 168 dan 170. Lajur 1 adalah 100-bp DNA ladder. (c) Lajur 2-16 masing-masing template DNA dari isolate bakteri kode 110, 111, 5584, 5585, 154, 159, 671, 672, 675, 676, 128, 130, 133, 137 dan 139. Lajur 1 adalah 100-bp DNA ladder

Figure 4a, 4b, and 4c. PCR profiles using specific primer *toxRF1* dan *toxRR1* gene and DNA templates from 24 *Vibrio* spp. isolates. (a) Lanes 2-7 DNA templates from isolate 1, 2, 3, 111, 5582 and 168 respectively. Lane 1 contains the 100-bp DNA ladder. (b) Lanes 2-10 DNA templates from isolate 1, 2, 3, 5582, 109, 120, 673, 168, and 170 respectively. Lane 1 contains the 100-bp DNA ladder. (c) Lanes 2-16 DNA templates from isolate 110, 111, 5584, 5585, 154, 159, 671, 672, 675, 676, 128, 130, 133, 137, and 139 respectively. Lane 1 contains the 100-bp DNA ladder

Tabel 2. Primer spesifik yang digunakan dalam penelitian
Table 2. Specific primers used in the study

Gen Gene	Produk gen Gene product	Nama primer Primer name	Sekuen primer (5' - 3') Primer sequence (5' - 3')	Panjang produk (bp) Product length (bp)	Referensi Reference
GyrB	Subunit B dari DNA gyrase	A2	TCTAACTATCCACCGCGG	363	Thaithongnum <i>et al.</i> (2006)
		B3	AGCAATGCCATCTTCACGTTC		
tox R	Regulator untuk transkriptor transmembrane	toxRF1	GAAGCAGCACTCACCGAT	382	Pang <i>et al.</i> (2005)
		toxRR1	GGTGAAGACTCATCAGCA		
vvh	Protein haemolysin	VHF1	ATCATGAATAAACTATTACGTTACT	1,257	Zhang <i>et al.</i> (2001)
		VHR1	GAAAGGATGGTTTGACAAT		
		VhemoR	GCTTGATAACACTTTTGCGGT		
				308	Conejero & Hedreyda (2004)

teramplifikasi berada pada panjang basa 240–260 bp. Berbeda dengan literatur rujukan yg panjang produk PCR untuk gen *toxR* sekitar 300 bp (Gambar 4a, 4b, dan 4c). Gen *toxR* pertama kali ditemukan pada bakteri *V. cholerae* sebagai regulator positif transkripsional dari gen *ctx* yang mengkode toksin pada *Vibrio cholera* (Pang *et al.*, 2005; Marlina, 2009). Kemudian gen ini ditemukan juga pada *V. parahaemolyticus*. Gen *toxR* secara spesifik mengkode protein transmembran yang memegang peranan penting pada regulasi gen toksin *ctx* dan beberapa gen-gen toksin lainnya. Gen *toxR* akan mengaktifkan gen-gen lainnya untuk menghasilkan produksi toksin yang berupa hemolisin atau toksin lainnya. toksin inilah yang menjadi senjata utama pada proses patogenisitas bakteri.

Keberadaan gen-gen virulen pada beberapa isolate bakteri mengindikasikan bahwa isolate bakteri tersebut memiliki potensi untuk menjadi patogen pada kondisi ling-

kungan yang mendukung. Gen *toxR* (Pang *et al.*, 2005) mengendalikan ekspresi beberapa enzim yang berperan dalam proses pelepasan toksin baik eksotoksin maupun endotoksin. Salah satu eksotoksin yang cukup berperan dalam proses patogenesis bakteri adalah hemolysin (Conejero & Hedreya, 2004). Gen spesifik *GyrB* walaupun terdeteksi pada hampir semua isolat bakteri namun terdapat perbedaan struktur dan susunan basa dari DNA penyusunnya. Gen *GyrB* pada umumnya menjadi target serangan antibiotik untuk melumpuhkan bakteri patogen. Jika gen *GyrB* dirusak maka proses amplifikasi gen-gen virulen yang dikendalikan oleh enzim gyrase tidak akan dapat berlangsung.

Dari uji dengan menggunakan primer-primernya spesifik tersebut terlihat bahwa gen virulen yang menentukan sifat patogen dari bakteri berpendar ini tersebar pada hampir semua isolat bakteri (Tabel 3). Dari Tabel 3 dapat dilihat bahwa pada satu isolat bakteri terdeteksi tidak

Tabel 3. Isolat bakteri yang memiliki gen virulen

Table 3. Bacteria isolates that have virulence gene

Kode bakteri <i>Bacteria code</i>	Asal <i>Source</i>	Gen-gen virulen <i>Virulence gene</i>		
		<i>Tox-R</i>	<i>Vhh</i>	<i>Gyr-B</i>
1	Banyuwangi	✓	✓	
2	Bali	✓	✓	
3	Bali	✓	✓	
5582	Maros		✓	✓
5584	Maros		✓	✓
5585	Maros			✓
109	Maros			✓
120	Maros			✓
128	Maros			✓
133	Maros			✓
137	Maros			✓
139	Maros			✓
154	Maros		✓	✓
159	Maros			✓
671	Maros		✓	
672	Maros	✓		✓
673	Maros	✓		
676	Maros		✓	✓
168	Takalar	✓		
170	Takalar	✓		

hanya satu gen penyandi sifat virulensi, misalnya: isolat 1, 2, dan 3 memiliki gen *toxR* dan *Vhh* namun tidak memiliki gen *GyrB*. Isolat bakteri 5582, 5584 dan 154 terdeteksi memiliki dua gen penyandi sifat virulensi yaitu *GyrB* dan *Vhh* (hemolysin). Namun adapula isolat bakteri yang terdeteksi hanya memiliki satu gen penyandi sifat virulensi seperti isolat 109 dan 120 yang hanya memiliki gen *GyrB* sedang isolat 154, 671, 676, dan 5584 hanya memiliki gen *Vhh*.

Seperti diketahui bakteri *Vibrio* sp. yang merupakan bakteri patogen oportunistik dapat berubah sifat dari saprofit menjadi patogen pada kondisi lingkungan dan kepadatan bakteri tertentu. Oleh karena itu perlu dilakukan deteksi dini untuk mengidentifikasi keberadaan bakteri ini pada lingkungan budidaya.

KESIMPULAN

Dari 35 isolat yang diisolasi, dari berbagai daerah (Banyuwangi, Bali, Maros, Takalar, dan Pinrang) 20 isolat terdeteksi memiliki gen penyandi sifat virulensi, di mana 8 di antaranya terdeteksi memiliki 2 gen penyandi sifat virulensi. Patogenisitas dari bakteri *Vibrio* sp. dapat dipengaruhi dari keberadaan gen-gen penyandi sifat virulensi pada susunan DNA-nya.

DAFTAR ACUAN

Alsina, M. & Blanch, A.R. 1994. A Set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *J. Applied Bacteriology*, (76): 79-85.

Austin, B. 1991. *Methods in Aquatic Bacteriology*. John Wiley and Sons. Chichester. New York. Brisbane. Toronto. Singapore, 425 pp.

Austin, B. & Austin, D.A. 1993. *Bacterial Fish Pathogens. Disease in Farmed and Wild Fish*. Second Edition. New York. London. Toronto. Sydney. Tokyo. Singapore, 384 pp.

Austin, B. & Zhang, X.-H. 2006. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Lett. Appl. Microbiol.* 43: 119-124.

Baumann, P., Furniss, A.L., & Lee, J.V. 1994. Facultative anaerobic gram negative rods. In J.G. Holt, N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, and S.T. Wilkins (Eds.), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth Edition. The William and Wilkins, Baltimore, Maryland, USA, p. 175-289.

Ben Haim, Y., Thompson, F.L., Thompson, C.C., Cnockaert, M.C., Hoste, B., Swings, J., & Rosenberg, E. 2003. *Vibrio coralliilyticus* sp. nov., a temperature-dependent pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 53: 309-315.

Benson, H.J. 1985. *Microbiological Applications: A Laboratory Manual in General Microbiology*. Fourth Edition. Wm. C. Brown Publishers. Dubuque, Iowa, 450 pp.

Cano-Gomez, A., Bourne, D.G., Hall, M.R., Owens, L., & Hoj, L. 2009. Molecular identification, typing and tracking of *Vibrio harveyi* in aquaculture systems: Current methods and future prospects. *Aquaculture*, 287: 1-10.

Conejero, M.J.U. & Hedreyda, C.T. 2004. PCR detection of hemolysin (*vhh*) gene in *Vibrio harveyi*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 50: 137-142.

Farmer, J.J. & Hickman-Brenner, F.W. 1992. The genera *Vibrio* and *Photobacterium*. In *The Prokaryotes—a Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*, Edited by A. Balows. New York: Springer, p. 2,952-3,011.

Karunasagar, I., Pai, R., Malathi, G.R., & Karunasagar, I. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*, 128: 203-209.

Kita-Tsukamoto, K., Oyaizu, H., Nanba, K., & Simidu, U., 1993. Phylogenetic relationships of marine bacteria, mainly members of the family Vibrionaceae, determined on the basis of 16S rRNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 43: 8-19.

Lavilla-Pitogo, C.R., Baticados, M.C.L., Cruz-Lacierda, E.R., & Pena, L.D. 1990. Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. *Aquaculture*, 91: 1-13.

Lavilla-Pitogo, C.R., Leano, E.M., & Paner, M.G. 1998. Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with dominance of luminescent vibrios in the rearing environment. *Aquaculture*, 164: 337-349.

Leano, E.M., Lavilla-Pitogo, C.R., & Paner, M.G. 1998. Bacterial flora in the hepatopancreas of pond-reared *Penaeus monodon* juveniles with luminous vibriosis *Aquaculture Development, Southeast Asian Fisheries Development Center, Tigbauan, 5021 Iloilo, Philippines. Aquaculture*, 164-1998, p. 367-374.

- Marlina. 2009. Identifikasi Bakteri *Vibrio Parahaemolyticus* dengan Metode Biolog dan Deteksi Gen ToxRnya secara PCR. *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi*, Vol. 13, No. 1.
- Muir, P. 1996a. *Media Used in Vibrio and Photobacterium Identification*. Department of Microbiology, Biomedical and Tropical Veterinary Sciences. James Cook University of North Queensland. Australia, 7 pp.
- Muir, P. 1996b. *Identification of Vibrio and Pseudomonas Bacteria*. Department of Microbiology, Biomedical and Tropical Veterinary Sciences. James Cook University of North Queensland. Australia, 6 pp.
- Pang, L., Zhang, X.H., Zhong, Y., Chen, J., Li, Y., & Austin, B. 2005. Identification of *Vibrio harveyi* using PCR amplification of the toxR gene. *Lett. Appl. Microbiol.*, 43: 249-255.
- Thaithongnum, S., Ratanama, R., Weeradechapol, K., Sukhoom, A., & Vuddhakul, V. 2006. Detection of *Vibrio harveyi* in shrimp postlarvae and hatchery tank water by the most probable number technique with PCR, *Aquaculture*, 261: 1-9.
- Yang, Y.K., Yeh, L.P., Cao, Y.H., Baumann, L., Baumann, P., Tang, J.E., & Beaman, B. 1983. Characterization of marine luminous bacteria isolated off the coast of China and description of *Vibrio orientalis* sp. nov. *Curr Microbiol.*, 8: 95-100. <http://mic.sgmjournals.org> 1777 Molecular identification of *V. harveyi*-related isolates.