

## Deteksi *Vibrio harveyi* menggunakan primer hemolisin pada benur udang windu *Penaeus monodon*

## Detection of *Vibrio harveyi* using hemolysin primer in tiger shrimp *Penaeus monodon*

Irma Suriyani<sup>1</sup>, Ince Ayu Khairana Kadriah<sup>2\*</sup>, Ilmiah Kuruseng<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Muslim Indonesia

Jl. Urip Sumiharjo. KM. 05 Makassar, Sulawesi Selatan 90231

<sup>2</sup>Balai Penelitian Pengembangan Budidaya Air Payau (BPPBAP)

Jl. Makmur Dg. Sitakka No. 129 Maros, Sulawesi Selatan 90512

\*Surel: inceayu@gmail.com

### ABSTRACT

This study was aimed to analyze the sensitivity and ability of primer hemolysin in detecting pathogenetic *Vibrio* on tiger shrimp post-larvae (PL) exposed under different exposure times in media inoculated with *Vibrio harveyi*. The PL of tiger shrimp were infected with  $10^6$  cfu/mL of *V. harveyi* by immersion method for three, six, 12, 24, 48 and 72 hours. The presence of hemolysin genes was detected by PCR techniques. The electrophoresis detected narrow hemolysin genes after PL were exposed for three and six hours. Clear visible bands of DNA *Vibrio* were observed for 12 hours of exposure. In contrast, no detected hemolysin gene of *Vibrio* was observed for PL exposed within 24, 48, and 72 hours. The rapid detection on *Vibrio* pathogenic for tiger shrimp PL should be conducted within three to 12 hours of exposure. No recommendation in utilizing this rapid detection for tiger shrimp PL exposed beyond 12 hours of *V. harveyi*.

Keywords: specific primer, luminous *Vibrio* bacteria, pathogenic, PCR method, hemolysin gene

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan atau sensitivitas primer hemolisin dalam mendeteksi *Vibrio* patogen dengan lama pemaparan berbeda. Penelitian ini dilakukan dengan menginfeksi *Vibrio harveyi* pada benur udang dengan metode perendaman pada konsentrasi  $10^6$  cfu/mL. Pengambilan sampel dilakukan pada waktu tiga, enam, 12, 24, 48, dan 72 jam pascainfeksi. Keberadaan gen hemolisin pada bakteri *V. harveyi* dideteksi menggunakan teknik *polymerase chain reaction* (PCR). Hasil elektroforesis memperlihatkan bahwa pada pemaparan tiga dan enam jam keberadaan gen hemolisin dari bakteri *Vibrio* patogen yang diinfeksi sudah dapat terdeteksi pada benur walaupun masih terlihat tipis. Pada pemaparan 12 jam terlihat sangat jelas pita-pita DNA dari bakteri patogen. Sedangkan pada pemaparan 24, 48, dan 72 jam sudah tidak terdeteksi lagi gen hemolisin dari bakteri *Vibrio*. Hal ini diduga disebabkan terjadinya penurunan populasi bakteri *Vibrio* yang hidup dalam tubuh dan media pemeliharaan udang. Pentingnya deteksi cepat diawal udang terinfeksi bakteri (3–12 jam) karena setelah 12 jam infeksi sudah sulit untuk mendeteksi keberadaan bakteri patogen di dalam tubuh udang.

Kata kunci: primer spesifik, bakteri *Vibrio* berpendar, patogenik, metode PCR, gen hemolisin

### PENDAHULUAN

Penyebab utama kegagalan budidaya udang windu (*Penaeus monodon*) di tambak didominasi oleh timbulnya penyakit, terutama oleh penyakit infeksi karena serangan agen patogen, seperti virus, bakteri, parasit, dan jamur (Austin & Zhang, 2006). Salah satu penyakit yang sering menyerang udang windu adalah Vibriosis yang disebabkan oleh bakteri berpendar dari genus

*Vibrio*. Adanya metode deteksi dini yang dapat dengan cepat mendeteksi adanya kontaminasi bakteri patogen *Vibrio* berpendar akan sangat membantu dalam penanganan dan pencegahan awal yang tepat waktu untuk mengurangi kematian udang. Telah diketahui bahwa kemampuan bakteri dalam menginfeksi inangnya juga dipengaruhi oleh kepadatan bakteri dalam media budidaya (Kadriah, 2012). Apabila keberadaan bakteri patogen dapat dideteksi sebelum

jumlahnya mencapai quorum, maka dapat segera dilakukan tindakan pencegahan untuk menekan perkembangan populasi bakteri patogen tersebut.

Bakteri *Vibrio* sangat sulit untuk diidentifikasi karena mereka memiliki ciri fenotip yang beragam. Teknik identifikasi biokimia melibatkan banyak tes yang mungkin memakan waktu lama dan biaya yang mahal. Pengembangan dan keberlanjutan industri udang membutuhkan teknik yang lebih cepat dan dapat diandalkan untuk identifikasi spesifik *Vibrio harveyi* untuk mengontrol patogen ini secara efektif. Saat ini beberapa referensi telah menjelaskan teknik deteksi berdasarkan metode *polymerase chain reaction* (PCR) dan spesies-spesifik sederhana, efektif, dan cepat untuk memfasilitasi deteksi dini dan identifikasi bakteri bercahaya dan nonbercahaya isolat *V. harveyi* (Chari & Dubey, 2006).

Gen spesifik yang dimiliki oleh bakteri *Vibrio* berpendar dapat digunakan sebagai penanda molekular dalam diagnosis cepat penyakit Vibriosis berpendar pada budidaya udang. Gen hemolisin diketahui merupakan salah satu gen spesifik yang dimiliki bakteri patogen termasuk bakteri *Vibrio*. Gen hemolisin adalah gen yang bertanggungjawab pada penghancuran membran sel darah atau proses hemolisis (Conejero & Hedreyda, 2004).

Gen yang mengkode hemolisin ini dilaporkan ditemukan pada beberapa spesies bakteri *Vibrio* di antaranya adalah *V. harveyi* (Zhang *et al.*, 2001 dan Zhang & Austin, 2005). Gen hemolisin dapat digunakan sebagai penanda untuk deteksi Vibriosis (Conejero & Hedreyda, 2004). Sekuen gen hemolisin ini bervariasi pada spesies bakteri yang berbeda, sehingga gen ini dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan bakteri *Vibrio* sampai pada tingkat spesies.

## BAHAN DAN METODE

### Penumbuhan bakteri

*V. harveyi* yang akan diuji ditanam pada media *thiosulfate citrate bile salt sucrosa agar* (TCBSA) selama 24 jam. Bakteri uji yang telah tumbuh pada media TCBSA diinokulasikan ke dalam media kultur cair *nutrient broth* (NB) sebanyak 1 ose. Subkultur dilakukan menggunakan alat pengocok dengan kecepatan 150 rpm selama 24 jam. Setelah 24 jam, 1 mL biakan subkultur dipindahkan ke dalam 100 mL media NB cair baru (kultur utama). Bakteri ditumbuhkan dalam media kultur utama ini selama empat jam, lalu biakan disentrifugasi pada 6000 rpm selama sepuluh menit untuk

memisahkan biakan bakteri dari media NB. Setelah disentrifugasi, biakan bakteri kemudian dimasukkan sebanyak 500 µL ke masing-masing tabung mikro. Sentrifugasi dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan dengan cara membuang supernatan sedangkan endapannya diambil. Pencucian terakhir dilakukan dengan *saline solution* (SS).

### Infeksi buatan dengan *Vibrio harveyi* patogen

Hewan uji yang digunakan adalah benur udang ukuran pascalarva (PL) 10–12 yang diperoleh dari Balai Budidaya Air Payau Takalar dan instalasi pembenihan udang windu BPPBAP (Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Payau). Infeksi buatan dilakukan dengan cara perendaman. Wadah yang digunakan dalam proses perendaman adalah akuarium berkapasitas 22 L sebanyak tiga buah. Setiap akuarium diisi air laut dengan salinitas 28 ppt yang telah disterilkan dengan kaporit 150 mg/L selama satu malam dan kemudian dinetralisir dengan *sodium thiosulfat* 75 mg/L. Volume air laut yang diisikan ke dalam akuarium sebanyak 10 L. Pada setiap akuarium ditebarkan benur sebanyak 300 ekor. Benur tersebut direndam di dalam air laut berisi biakan bakteri 10<sup>6</sup> cfu/mL selama tiga, enam, 12, 24, 48, dan 72 jam sebagai perlakuan dengan masing-masing tiga kali ulangan.

### Ekstraksi DNA

Isolasi genom bakteri *Vibrio* patogen yang menginfeksi benur dilakukan menggunakan metode *dodecyl trimethyl ammonium bromide/cetyl trimethyl ammonium bromide* (DTAB-CTAB). Proses ini diawali dengan menimbang sampel sebanyak 30 mg. kemudian dihaluskan dengan penggerus. Lalu ditambahkan DTAB Solution 600 µL kemudian dicampur menggunakan penggerus, lalu dihomogenkan selama 20 detik. Kemudian diinkubasi diatas *thermoblock biometra* (TB) selama lima menit pada suhu 75 °C, lalu didinginkan pada suhu ruang, selanjutnya, dihomogenkan lagi dan dipresipitasi. Selanjutnya ditambahkan kloroform sebanyak 700 µL lalu dihomogenkan selama 20 detik. Kemudian disentrifugasi selama lima menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Selanjutnya diambil cairan jernih paling atas, dimasukkan ke dalam tabung mikro 2 mL lalu ditambahkan CTAB solution sebanyak 100 µL dan ddH<sub>2</sub>O sebanyak 900 µL, kemudian dihomogenkan lalu diinkubasi selama lima menit pada suhu 75 °C setelah itu didinginkan pada suhu ruang.

Kemudian disentrifugasi selama sepuluh menit dengan kecepatan 12.000 rpm lalu supernatan dibuang dan ditambahkan *dissolve solution* sebanyak 150  $\mu\text{L}$  kemudian diinkubasi selama lima menit pada suhu 75 °C setelah itu didinginkan pada suhu ruang, lalu disentrifugasi selama lima menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Supernatan diambil dan dipindahkan ke tabung mikro baru lalu ditambahkan etanol dingin 95% sebanyak 300  $\mu\text{L}$ , kemudian divorteks. Kemudian disentrifugasi selama lima menit dengan kecepatan 12.000 rpm, supernatan dibuang secara perlahan-lahan, kemudian ditambahkan etanol 70% sebanyak 200  $\mu\text{L}$  lalu disentrifugasi selama lima menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Kemudian ethanol dibuang lalu tabung mikro dibalikkan di atas tisu selama dua jam untuk proses pengeringan DNA. Setelah dua jam ditambahkan *tris* EDTA (TE) *buffer* 200  $\mu\text{L}$  kemudian DNA disimpan pada suhu 20 °C.

#### Deteksi *Vibrio harveyi* menggunakan primer hemolisin

##### *Prosedur amplifikasi DNA dengan metode PCR*

Amplifikasi genom DNA udang dilakukan dengan metode PCR menggunakan penanda spesifik IAVh sebagai pendeteksi keberadaan gen hemolisin pada sampel. Larutan *master mix* dibuat dengan mencampur 10x *dream taq buffer* (mengandung 20 mM  $\text{MgCl}_2$ ) 5  $\mu\text{L}$ , *dNTP mix* 5  $\mu\text{L}$ , dan *DreamTaq DNA polymerase* 0,25  $\mu\text{L}$ . Kemudian ditambahkan masing-masing 1  $\mu\text{L}$  primer IAVh *forward* dan *reverse* (Kadriah, 2012) serta  $\text{ddH}_2\text{O}$  sampai volume total 49  $\mu\text{L}$ . Setelah larutan dihomogenkan selanjutnya dimasukkan templat DNA sebanyak 1  $\mu\text{L}$ . Program PCR diatur sebanyak 25 siklus pada suhu denaturasi 94 °C selama satu menit, annealing 63 °C, selama satu menit 30 detik, dan elongasi 68 °C selama satu menit 30 detik serta tahap ekstra elongasi 72 °C selama sepuluh menit. Proses PCR ini dilakukan dua kali (re-PCR) untuk meningkatkan sensitivitas hasil deteksi.

Hasil PCR diaplikasikan pada gel agarosa 2% sebanyak 3  $\mu\text{L}$  ditambahkan *loading dye* 2  $\mu\text{L}$  kondisi *running* pada *minigel*: voltase 150 V, kuat ampere 70 waktu *running* 30 menit. *Buffer* yang digunakan adalah *buffer tris boric EDTA* (TBE). DNA *ladder* 5  $\mu\text{L}$  juga diaplikasikan pada gel yang sama sebagai marker untuk mengetahui panjang pita DNA udang. Kontrol positif berupa bakteri *V. harveyi* koleksi Kadriah (2012) digunakan sebagai pembanding. Hasil visualisasi pada gel elektroforesis yang menunjukkan adanya pita pada panjang basa 151 bp untuk gen hemolisin

menunjukkan adanya bakteri *Vibrio* berpendar patogenik yang menginfeksi sampel udang yang dikoleksi.

#### Analisis data

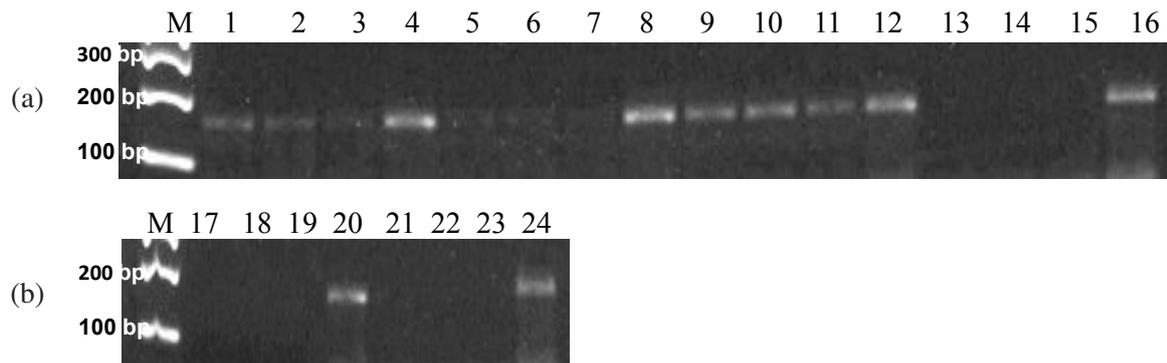
Analisis data dilakukan secara deskriptif keberadaan gen hemolisin dengan melihat pita-pita DNA hasil PCR, menggunakan primer hemolisin pada sample benur yang diinfeksi *V. harveyi* dengan lama pemaparan berbeda.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengamatan keberadaan *V. harveyi* yang dapat terdeteksi menggunakan primer hemolisin dapat dilihat hasil elektroforesis pada gambar 1. Pada uji aplikasi penanda spesifik yaitu primer IAVh dan IAVhR1 untuk deteksi keberadaan gen hemolisin bakteri *V. harveyi* dari sampel benur dapat dilihat adanya perbedaan dari gambar elektroforesis yang dihasilkan. Pada pemaparan tiga (kolom No. 1–2) dan enam jam (kolom no. 3–4) sudah dapat terdeteksi keberadaan gen hemolisin dari bakteri *Vibrio* patogen walaupun masih terlihat tipis.

Pada pemaparan 12 jam terlihat sangat jelas pita-pita DNA dari bakteri patogen (Gambar 1a), sedangkan pada pemaparan 24, 48, dan 72 jam (Gambar 1b) sudah tidak terdeteksi gen hemolisin dari bakteri *Vibrio*. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Kadriah (2012) hal ini disebabkan terjadinya penurunan populasi bakteri *Vibrio* yang hidup dalam tubuh dan media pemeliharaan udang. Kadriah *et al.* (2012) menjelaskan bahwa populasi bakteri tertinggi pada pengamatan enam dan 12 jam setelah infeksi diperoleh dari perlakuan isolat 1 dengan konsentrasi  $10^7$  cfu/mL. Namun secara umum populasi bakteri terlihat menurun setelah enam jam pascainfeksi pada semua perlakuan. Menurut Kadriah *et al.* (2012), menurunnya tingkat patogenisitas bakteri setelah 12 jam perlakuan diduga berhubungan dengan penurunan populasi bakteri pada media uji. Seperti diketahui bahwa uji patogenisitas dengan metode perendaman sangat dipengaruhi oleh populasi bakteri yang bertahan hidup pada media pemeliharaan.

Bakteri *Vibrio* dapat menjadi penyebab penyakit yang utama namun sering kali juga bertindak sebagai agen oportunistik pada infeksi sekunder. Bakteri *Vibrio* sebagai penyebab penyakit yang utama dan pertama (Reynaud *et al.*, 2008; Kadriah, 2012) serta dapat pula sebagai patogen oportunistik (Reynaud *et al.*, 2008)



Gambar 1. Hasil PCR benur udang windu yang diinfeksi dengan *Vibrio harveyi* dengan lama pemaparan yang berbeda. (a) M: *marker*, 1–3 : Pemaparan tiga jam, 4: kontrol positif(KP), 5–7: pemaparan enam jam, 8: KP, 9–11: pemaparan 12 jam, 12: KP, 13–15: pemaparan 24 jam, 16: KP, (b) M: *marker*, 17–19: pemaparan 48 jam: 20: KP, 21–23: pemaparan 72 jam; 24: KP.

memanfaatkan kesempatan melemahnya sistem pertahanan tubuh udang setelah serangan patogen lainnya. Udang tidak mampu lagi mengeliminir keberadaan bakteri dalam tubuhnya sehingga berakibat kematian. Konsekuensi dari pelarangan penggunaan hampir semua jenis antibiotik dalam sistem budidaya menyebabkan perlunya teknologi alternatif untuk mencegah dan mengendalikan bakteri patogen (Karunasagar *et al.*, 2007).

Identifikasi dengan target gen spesifik penyandi sifat virulensi menjadi salah satu metode deteksi bakteri patogen. Beberapa gen pengatur sifat virulensi diantaranya adalah *cholera toxin enzymatic subunit* (*ctxA*), *zonula occludens toxin* (*zot*), *accessory cholera enterotoxin* (*ace*), *toxin-coregulated pilus* (*tcpA*), *outer membrane protein* (*ompU*), *central regulatory protein* *ToxR* (*toxR*), dan *haemolysin* (*hlyA*) (Pengsuk, 2010). Salah satu gen yang terlibat dalam proses patogen bakteri *Vibrio* adalah gen hemolisin, yaitu gen yang terlibat dalam proses penghancuran membran sel darah (hemolisis) dan telah dilaporkan dimiliki oleh beberapa spesies bakteri *Vibrio* (Conejero & Hedreyda, 2004).

Pentingnya deteksi cepat sejak awal udang terinfeksi bakteri (3–12 jam) karena setelah 12 jam infeksi, sudah sulit untuk mendeteksi keberadaan bakteri patogen di dalam tubuh udang. Hasil elektroforesis yang menunjukkan tidak adanya pita pada *sampling* setelah 12 jam pascainfeksi, tidak berarti bahwa tidak ada bakteri patogen dalam tubuh udang, alat deteksi yang digunakan tidak mampu mendeteksinya karena populasi bakteri menurun. Penelitian ini menunjukkan bahwa keberadaan bakteri *V. harveyi* dapat dideteksi secara dini menggunakan primer hemolisin IAVhF1 dan IAVhR1, dan primer ini telah diuji spesifisitas dan sensitivitasnya. Perlu dipertimbangkan bahwa penurunan populasi

ini hanya terjadi di Laboratorium, tetapi pada kenyataannya di alam tidak demikian. Populasi bakteri akan semakin meningkat jika sudah menginfeksi udang.

Primer yang ideal adalah primer yang memiliki keseimbangan antara spesifisitas dan sensitivitas. Spesifisitas suatu primer dapat dinilai dari frekuensi terjadinya *misspriming* (kesalahan penempelan) primer pada tempat yang tidak seharusnya. Primer dengan spesifisitas buruk akan terlihat dari banyaknya pita-pita yang tidak diinginkan saat produk PCR divisualisasi dengan gel elektroforesis (Kadriah, 2012). Primer dengan spesifisitas tinggi hanya akan mengamplifikasi daerah tertentu dari DNA *template* sehingga menghasilkan pita DNA tunggal pada hasil elektroforesis. Sensitivitas adalah seberapa limit minimum deteksi sebagai perolehan jumlah produk PCR dengan nilai teoritis yang seharusnya dicapai. Adanya metode deteksi dini yang dapat dengan cepat mendeteksi adanya infeksi bakteri *Vibrio* berpendar patogenik akan sangat membantu dalam penanganan dan pencegahan awal yang tepat waktu untuk mengurangi kematian udang. Hasil penelitian ini membuktikan bahwa metode PCR merupakan metode deteksi yang paling cepat, spesifik, dan sensitif dibandingkan dengan metode histologi dan agar sebar. Keakuratan data hasil deteksi dengan metode PCR sangat didukung oleh spesifisitas dan sensitivitas primer yang digunakan sebagai penanda marka molekuler pendeteksi DNA.

## KESIMPULAN

Sensitivitas dari primer hemolisin (IAVhF1 dan IAVhR1) dalam mendeteksi keberadaan *V. harveyi* pada benur udang terjadi pada selang waktu tiga sampai 12 jam pascainfeksi.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Dr. Ir. A. Parenrengi, MSc selaku kepala Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Payau serta Ir. Muharijadi Atmomarsono, MSc selaku kepala kelompok peneliti Kesehatan Ikan dan Lingkungan BPPBAP yang telah memberikan izin pada penulis untuk melaksanakan penelitian.

### DAFTAR PUSTAKA

- Austin B, Zhang XH. 2006. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in Applied Microbiology* 43: 119–124.
- Chari PVB, Dubey SK. 2006. Rapid and specific detection of luminous and non-luminous *Vibrio harveyi* isolates by PCR amplification. *Current Science* 90: 1.105–1.108.
- Conejero MJU, Hedreyda CT. 2004. PCR detection of hemolysin (vhh) gene in *Vibrio harveyi*. *The Journal of General and Applied Microbiology* 50: 137–142.
- Kadriah IAK. 2012. Pengembangan metode deteksi cepat *Vibrio* berpendar patogenik pada udang penaeid [Disertasi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Karunasagar I, Shivu MM, Girisha SK, Krohne G, Iddya K. 2007. Biocontrol of pathogens in shrimp hatcheries using bacteriophages. *Aquaculture* 268: 288–292.
- Pengsuk C, Longyant S, Rukpratanporn S, Chaivisuthangkura P, Sridulyakul P, Sithigorngul P. 2010. Development of monoclonal antibodies for simple detection and differentiation of *Vibrio mimicus* from *Vibrio cholerae* and *Vibrio* spp. by dot blotting. *Aquaculture* 300: 17–24.
- Reynaud Y, Saulnier D, Mazel D, Goarant C, Le Roux F. 2008. Correlation between detection of a plasmid and high-level virulence of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of the shrimp *Litopenaeus stylirostris*. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 3.038–3.047.
- Zhang XH, Austin B. 2005. A review: haemolysins in *Vibrio* species. *Journal of Applied Microbiology* 98: 1.011–1.019.
- Zhang XH, Meaden PG, Austin B. 2001. Duplication of hemolysin genes in a virulent isolate of *Vibrio harveyi*. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 3.161–3.167.