



Analisis Keanekaragaman Genus *Vibrio* pada Udang Terinfeksi *Enterocytozoon Hepatopenaei* (EHP) dengan Metode *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction* (ERIC PCR)

Diversity Analysis of Genus *Vibrio* in *Enterocytozoon Hepatopenaei* (EHP) Infected Shrimp with *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction* (ERIC PCR) Method

Fenny Amelia¹, Beni Halalludin², Sidrotun Naim^{1,3} dan Rega Permana^{4*}

¹Program Studi Biologi, Fakultas Ilmu Hayati, Universitas Surya, Jl. M.H. Thamrin Km 2.7, Kota Tangerang 15143, Indonesia

²Animal Health Service Laboratory, PT. Central Proteina Prima, Jl. Anggerek 3 Blok EA No.11, Kota Tangerang 15560, Indonesia

³Program Studi Teknik Lingkungan, Fakultas Teknik, Universitas Surya, Jl. M.H. Thamrin Km 2.7, Kota Tangerang 15143, Indonesia

⁴Departemen Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Padjadjaran, Jalan Raya Bandung-Sumedang KM.21 Jatinangor, Kabupaten Sumedang 45363, Indonesia

*Correspondence :
rega.permana@unpad.ac.id

Received : 2020-04-29
Accepted : 2020-07-06

Kata Kunci :
Enterocytozoon Hepatopenaei, ERIC PCR, Udang *vaname*, *Vibrio*

Keywords :
Enterocytozoon Hepatopenaei, ERIC PCR, *Vannamei shrimp*, *Vibrio*

Abstrak

Udang merupakan salah satu komoditas unggulan nasional dan memiliki nilai ekonomi yang tinggi. Produksi udang budidaya di Indonesia tahun 2012-2017 mengalami kenaikan secara signifikan. Meski mengalami kenaikan, masih terdapat masalah yang harus diatasi, salah satunya adalah penyakit yang disebabkan oleh parasit *Enterocytozoon Hepatopenaei* (EHP). Infeksi EHP mengganggu sel tubulus hepatopankreas. Lesi yang disebabkan oleh EHP dapat menjadi tempat pertumbuhan koloni *Vibrio* sehingga meningkatkan kemungkinan munculnya penyakit lain. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keanekaragaman *Vibrio* pada udang terinfeksi EHP yang dianalisis dengan *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction* (ERIC PCR). ERIC PCR dapat membedakan strain bakteri yang berkerabat dekat, prosedur kerja yang sederhana, cepat dan murah. Bakteri *Vibrio* diisolasi dari hepatopankreas, feses dan air udang terinfeksi EHP dan udang sehat (kontrol), dilanjutkan dengan ekstraksi DNA, ERIC PCR, elektroforesis dan konstruksi pohon filogenetik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah bakteri *Vibrio* pada hepatopankreas, air dan feses udang terinfeksi EHP lebih tinggi dibandingkan dengan udang sehat. Udang terinfeksi EHP memiliki keanekaragaman *Vibrio* yang lebih rendah dari pada udang sehat. Hal ini menunjukkan adanya spesies *Vibrio* spesifik yang mendominasi pada udang terinfeksi EHP.

Abstract

Indonesian cultivation of shrimp production increased significantly in 2012-2017. Despite this, there are still problems that need to be solved, and one of them is the disease caused by *Enterocytozoon Hepatopenaei* (EHP). Infection of EHP disturbed hepatopancreatic tubular cells. The lesion caused by EHP allows *Vibrio* to form colonies in the cell, increasing shrimps' susceptibility to other diseases. This study aimed to determine the number of *Vibrio* colonies and *Vibrio* diversity in EHP-infected shrimp analyzed by Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction (ERIC PCR). This method can differentiate closely related bacteria strain with simple, fast, and cheap procedure. *Vibrio* bacteria were isolated from hepatopancreas, feces, and water of EHP infected shrimp and healthy shrimp (control), followed by genome extraction, ERIC PCR, electrophoresis, and phylogenetic tree construction. The results showed that the number of *Vibrio* bacteria in hepatopancreas, water, and feces of EHP-infected shrimp were higher than healthy shrimp. Infected shrimp with EHP have lower *Vibrio* diversity than the healthy shrimp. This indicating that some specific *Vibrio* species dominated the infected shrimp.

PENDAHULUAN

Udang merupakan salah satu komoditas unggulan nasional dan memiliki nilai ekonomi yang tinggi. Berdasarkan Pusat Data Statistik, Kementerian Kelautan dan Perikanan (2018), produksi udang budidaya pada tahun 2012 hingga 2017 secara keseluruhan mengalami kenaikan. Meski produksi budidaya udang mengalami kenaikan, penyakit pada udang menjadi penghambat utama untuk pengembangan budidaya udang (Selvin *et al.*, 2015). Salah satu penyakit yang muncul pada udang disebabkan oleh parasit *Enterocytozoon Hepatopenaei* (EHP).

EHP merupakan parasit mikrosporidian pada udang windu dan vaname. Parasit EHP pertama kali diidentifikasi dan dikarakterisasi pada udang windu (*Penaeus monodon*) di Thailand pada tahun 2009. EHP menginfeksi sitoplasma dari sel tubulus epitelial dari hepatopankreas udang (Tourtip *et al.*, 2009). Pada uji laboratorium, udang vaname yang terinfeksi EHP meningkatkan kerentanan akan infeksi *Vibrio* yang berasosiasi dengan *Acute Hepatopancreatic Necrosis*

Diseases (AHPND). Infeksi EHP mengganggu sel tubulus hepatopankreas dan *Vibrio* yang sudah ada membentuk koloni pada sel tersebut (Aranguren *et al.*, 2017).

Terdapat beberapa metode yang digunakan untuk identifikasi *Vibrio*, antara lain *Ribotyping*, *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), *Repetitive Extragenic Palindromes* (REP), dan *Pulse Field Gel Electrophoresis* (PFGE). Metode-metode tersebut memberikan informasi dan wawasan baru mengenai struktur populasi dan identifikasi organisme dari famili Vibrionaceae. Metode yang paling sering digunakan adalah rep-PCR terutama *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction* (ERIC PCR) karena dapat menunjukkan perbedaan yang sangat jelas dan memberikan reproduksibilitas yang lebih baik (Wong dan Lin, 2001; Gomez-Gil *et al.*, 2014).

ERIC-PCR merupakan metode penapisan DNA (*DNA fingerprinting*) berdasarkan sekuen yang repetitif (ERIC) pada genom bakteri. Elemen ERIC sangat lestari dan sangat bervariasi antar spesies,

memiliki panjang 127 pasang basa (Sharples dan Lloyd, 1990). Teknik ERIC-PCR sering digunakan karena ERIC-PCR dapat membedakan strain bakteri yang berkerabat dekat, prosedur kerja sederhana, cepat, dan murah (Bilung *et al.*, 2018; Asgarani *et al.*, 2015). ERIC PCR telah berhasil digunakan untuk menganalisis keanekaragaman strain *Mycobacterium tuberculosis* (Sechi *et al.*, 1998), *Vibrio parahaemolyticus* yang diisolasi dari kerang di Padang, Indonesia (Zulkifli *et al.*, 2009), *Vibrio cholerae* dari es batu di Jakarta, Indonesia (Waturangi *et al.*, 2012), dan *Vibrio parahaemolyticus* yang berasosiasi dengan AHPND (Feng *et al.*, 2017). Penggunaan ERIC PCR untuk menganalisis keanekaragaman spesies *Vibrio* pada udang yang terinfeksi EHP masih belum banyak dilaporkan. Penelitian ini dilakukan untuk menganalisis keanekaragaman *Vibrio* pada udang yang terinfeksi EHP dengan ERIC PCR.

METODOLOGI

Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan di laboratorium *Animal Health Service* dan laboratorium *Disease Research Center* PT. Central Proteina Prima Tbk, Tangerang, Banten 15560. Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari-Juni 2019.

Materi Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah akuarium volume 150 L, neraca analitik (AL204, Mettler Toledo, USA), keramba kain, *shaking incubator* (VS-8480SL, Bionex Vision Scientific, Co. Ltd., Korea), cawan petri (3160-102, Pyrex, Prancis), Erlenmeyer (Iwaki, Indonesia), *hotplate* (SP18425Q Nuova Stirplate, Thermo Scientific, USA), *Laminar Clean Bench* (Airstream Gen 3 Laminar Flow Clean Benches, Esco, Singapura), gelas ukur (Graduated Cylinders, PP, Class B, with raised blue scale Plasti Brand, VitLab, Jerman), *magnetic stirrer bar*, spatula, autoklaf (Tomy SX-700, Tomy Digital Biology,

Jepang), tabung reaksi (Iwaki, Indonesia), botol Schott (laboratory bottle with din thread, Duran, Jepang), oven (UN 450, Memmert, Jerman), botol vial, mikropipet (P2L, P10L, P20L, P100L, Gilson, USA dan Eppendorf, Jerman), tips (D10, Pipetman Diamond Tips D10, Gilson, USA), *spreader*, inkubator (IN 750 plus, Memmert, Jerman), *colony counter*, kulkas (GN-B422SQCL, LG, Korea), *microtube* (1.5 ml, Axygen, USA), bunsen, korek api, *micropesstle* (SIAL501ZZO, Merck, Jerman), kulkas -80 °C (New Brunswick Scientific U360 Innova, Eppendorf, Jerman), pipet tetes (plastik 5 ml, Onemed, Indonesia), *stopwatch* (H-2017, Hoseki, Jepang), gelas *beaker* (Pyrex, Prancis), pH meter (S20 SevenEasy, Mettler Toledo, USA), lup inokulasi, microwave (R21DOSIN, Sharp, Jepang), DNA *column* (Axygen, USA), mesin *thermocycler* (Veriti 96-well Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, USA), *chamber electrophoresis* (Owl EasyCast B2, Thermo Fisher Scientific, USA), dan *gel documentation* (UVITEC UVIDoc HD2, Cambridge, UK).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah juvenil udang sehat dan udang terinfeksi EHP yang didapatkan dari PT. CP Prima, air laut (asli dari pesisir laut Tangerang), pakan udang komersial (Feng Li Gold, PT. Matahari Sakti, Indonesia), aluminium foil (*Total Wrap*), media TCBS (Difco, Thermo Fisher Scientific, USA), media TSA (Difco), media TSB (Difco), akuades steril, natrium klorida (Merck, Jerman), jarum suntik, larutan etanol absolut (Merck, Thermo Fisher Scientific, USA), larutan KOH 3% (Emsure, Merck, Thermo Fisher Scientific, USA), reagen oksidase (N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylene-diaminedihydrochloride, Sigma-Aldrich, Jerman), medium OF Basal (Difco, Thermo Fisher Scientific, USA), glukosa (Merck, Jerman), reagen katalase H₂O₂ (OneMed, Indonesia), 0,25% SDS (Thermo Fisher Scientific, USA), *buffer* LB (Thermo Fisher Scientific, USA), etanol 75% (Thermo Fisher Scientific, USA), *nuclease free water* (Thermo Fisher

Scientific, USA), master mix *GoTaq Green* 2x (Promega, USA), primer ERIC 1R dan 2F dari PT. CP Prima (confidential PT. CPP), Agarosa (Bioron, Jerman), *boric acid* (Emsure, Merck, Thermo Fisher Scientific, USA), trisbase (Himedia, USA), EDTA (Emsure, Merck, Thermo Fisher Scientific, USA), *loading dye* HydraGreen (Thermo Fisher Scientific, USA), marker 10 kb (log 2, Biolabs Inc, USA), masker (Sensi, PT. Media Mitra Pratama, Indonesia), dan sarung tangan (Sempermed, Singapura).

Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan secara eksperimental meliputi *bioassay* EHP, isolasi dan kuantifikasi bakteri dari hepatopankreas, feses dan air serta analisis keanekaragaman menggunakan ERIC PCR. Rangkaian eksperimen akan dilakukan pada kelompok udang sehat dan kelompok udang yang terinfeksi EHP sehingga gambaran mengenai perbedaan kelimpahan bakteri pada dua kelompok ini akan terlihat dengan jelas.

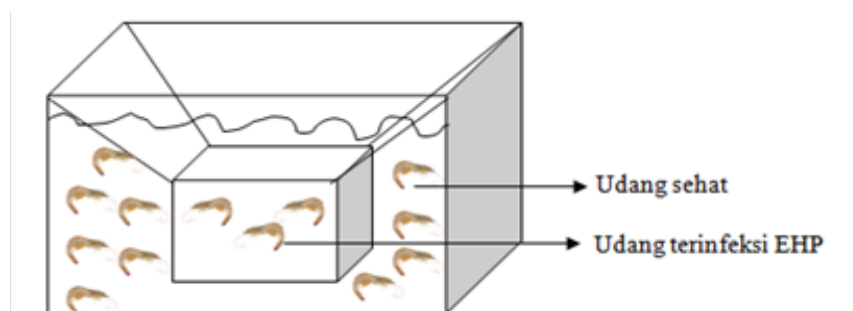
Prosedur Kerja

Bioassay EHP

Sebelum *bioassay* EHP dilakukan, udang sehat dan udang EHP diambil untuk mengkonfirmasi infeksi dengan metode *nested* PCR. *Nested* PCR EHP menargetkan gen pengkode protein dinding spora (*spore wall protein* atau SWP) dari EHP. Panjang amplicon yang dihasilkan sebesar 148 pasang basa (Itsathitphaisarn *et al.*, 2017). Metode *bioassay* EHP yang dilakukan adalah kohabitasi, mengikuti protokol dari PT. CP Prima (unpublished).

Sebanyak enam akuarium 150 L diisi dengan air laut (salinitas 20 ppt). Tiga akuarium diisi dengan 10 udang sehat (31-33 gram) dan 3 udang terinfeksi EHP secara alami (8-9 gram). Tiga akuarium lainnya diisi dengan 10 udang sehat (31-33 gram) dan 3 udang sehat (8-9 gram) sebagai kontrol. Penggunaan kedua ukuran udang yang berbeda berdasarkan pada hasil penelitian PT. CP Prima, dimana pada jumlah dan berat udang tersebut infeksi EHP lebih optimal (unpublished). Udang terinfeksi EHP dan udang sehat dipisahkan dengan keramba untuk mencegah kontak kedua kelompok.

Tiga hari setelah infeksi dilakukan, udang di dalam keramba diangkat. Persentase pakan harian (*feeding rate*) udang dengan massa \pm 3 gram adalah 5%. Berat pakan udang harian udang di luar keramba sebesar 0.8 gram, diberikan empat kali sehari hingga eksperimen selesai dilakukan. Sedangkan berat pakan udang dalam keramba setengah dari *feeding rate*, sebesar 0.4 gram. Pengamatan dilakukan sampai 14-31 hari setelah udang sakit dalam keramba diangkat. Setelah pengamatan sampai hari ke-31, semua udang kemudian diambil dari akuarium dan dipisahkan menjadi dua kelompok, yaitu udang sehat dan udang terinfeksi EHP berdasarkan hasil uji PCR dan pengamatan morfologi hepatopankreas. Setelah dikelompokkan, diambil untuk menghitung total bakteri (TVC) dan *Vibrio* (PVC) pada hepatopankreas. Kelimpahan bakteri total dan bakteri *Vibrio* pada air dan feses dihitung setiap satu minggu sekali.



Gambar 1. Desain eksperimen *bioassay*.

Menghitung Bakteri Total dan Terduga *Vibrio*

Jumlah bakteri total dan terduga *Vibrio* pada hepatopankreas udang sehat dan udang terinfeksi EHP dihitung pada hari ke-0 dan 31 menggunakan metode *Total Viable Count* (TVC) dan metode *Planctobacteria Viable Count* (PVC). Bakteri juga diisolasi menggunakan metode *spread plate* untuk dikarakterisasi secara biokimia dan dilanjutkan dengan ERIC PCR.

Karakterisasi Isolat *Vibrio*

Karakterisasi isolat *Vibrio* dilakukan dengan pengamatan morfologi koloni dan uji biokimia. Morfologi koloni diamati dengan mengisolasi bakteri menggunakan media TCBS dan TSA+ kemudian diinkubasi pada suhu 30 °C selama 18-24 jam. Uji biokimia yang dilakukan meliputi uji salinitas pada media TSA dengan NaCl 2%, uji gram dengan KOH 3%, uji oksidase menggunakan tetrametil-p-fenilendiamin-dihidroklorida, uji katalase dengan H₂O₂, dan uji oksidasi glukosa pada media OF Basal (DIFCO).

Prosedur ERIC PCR

Primer yang digunakan untuk ERIC PCR yaitu ERIC F(5'→3'): AAGTAA-GTGA CTGGGGTGAGCG dan ERIC R' (3'→5'): ATGTAAGCTCCTGGGGATT-CAC. DNA dari isolat *Vibrio* diekstraksi menggunakan metode dari PT. CP Prima (unpublished). Total campuran reaksi (*reaction mixture*) adalah 25 µl, terdiri dari 12,5 µL master mix GoTaq Green 2x, 6 µL *nuclease free water*, 2,5 µL primer F, 2,5 µL primer R, dan 1,5 µL DNA *template*. Amplifikasi dilakukan dengan mengikuti parameter sebagai berikut: *initial denaturation* pada 95 °C selama 5 menit 1 kali, diikuti 30 siklus *pre-denaturasi* 90 °C selama 30 detik, *annealing* 50 °C selama 30 detik, *ekstensi* (*extension*) 52 °C selama 1 menit, 72°C selama 1 menit, kemudian ekstensi akhir (*final extension*) 72 °C selama 8 menit 1 kali.

Elektroforesis Gel Agarosa

Prosedur elektroforesis gel agarosa mengikuti protokol PT. CP Prima (unpublished). Hasil amplifikasi ERIC PCR dilakukan elektroforesis pada gel agarosa 1.2% dalam 1x Tris-Borate-EDTA (TBE) dan 3 µl *loading dye* HydraGreen. Sebanyak 8 µl produk PCR masukkan ke dalam sumuran. Pada sumuran lain ditambahkan *marker* 10 kb. Elektroforesis dilakukan dengan waktu 100 menit, 80 volt, 400 ampere. Hasil elektroforesis tidak ditambahkan dengan reagen pewarnaan asam nukleat karena saat pembuatan agarosa sudah ditambahkan dengan pewarna Hydra Green, divisualisasi dengan *Gel documentation*.

Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian dianalisis dengan mengonstruksi pohon filogenetik *Vibrio* dari udang sehat dan udang yang terinfeksi EHP hasil ERIC-PCR yang sudah divisualisasi. Konstruksi pohon filogenetik dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak *Paleontological Statistics* versi 3 (Past3). Kemudian hasil akan dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil *Bioassay* EHP

Hasil PCR menunjukkan bahwa udang sehat tidak terinfeksi EHP (negatif) dan udang EHP positif terinfeksi EHP. Udang terinfeksi EHP menunjukkan warna hepatopankreas yang lebih pucat dan memiliki ukuran yang lebih beragam karena pertumbuhan yang terhambat. Udang sehat (kontrol) memiliki ukuran yang tidak jauh berbeda. Udang kontrol terbesar memiliki berat 9,44 gram, terkecil memiliki berat 6,16 gram. Sedangkan udang terinfeksi EHP terbesar memiliki berat 9,01 gram, dan terkecil memiliki berat 2,91 gram. Ukuran udang EHP bervariasi sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Rajendran *et al.* (2016).

Tabel 1. Massa udang setelah *bioassay* kohabitasi hari ke-31.

	Kontrol (Gram)	EHP (Gram)
I	78,06	76,69 (Negatif EHP)
II	70,93	57,81
III	70,17	55,86
Rata-rata	73,05 ± 3,55	56,83 ± 9,35

Pada akuarium EHP I menunjukkan udang tidak terinfeksi EHP. Hal ini disebabkan karena pada fase kohabitasi dari tiga udang terinfeksi EHP yang digunakan, dua diantaranya mati sehingga proses infeksi EHP terhadap udang lain kurang kuat. EHP menginfeksi sitoplasma dari sel tubulus epitelial dari hepatopankreas udang, sehingga merusak kemampuan hepatopankreas untuk menyerap nutrisi dari makanan dan menyebabkan pertumbuhan udang terhambat (Tourtip *et al.*, 2009; Newman, 2015). Terhambatnya pertumbuhan udang terinfeksi EHP menyebabkan berat udang menjadi lebih ringan dari pada udang sehat.

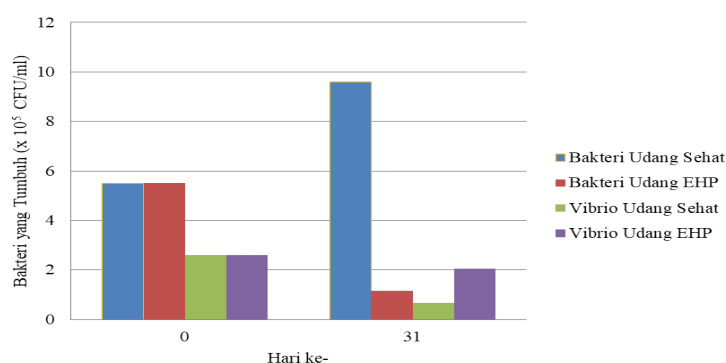
Jumlah Bakteri Total dan Terduga *Vibrio*

Jumlah bakteri total pada hepatopankreas udang sehat mengalami kenaikan setelah 31 hari kultur. Sedangkan pada udang terinfeksi EHP jumlah bakteri total mengalami penurunan. Jumlah bakteri *Vibrio* pada hepatopankreas udang sehat dan udang terinfeksi EHP mengalami penurunan (Gambar 2). Perkembangan infeksi EHP yang lambat (kronis) dan kondisi

lingkungan yang lebih baik daripada tempat pemeliharaan sebelumnya menyebabkan mikroflora pada udang mengalami perbaikan (Rajendran *et al.*, 2016). Lingkungan dan sistem imun udang yang baik menyebabkan jumlah *Vibrio* pada hepatopankreas cenderung menurun. Infeksi EHP tidak berlangsung cepat, sehingga jumlah *Vibrio* pada udang terinfeksi EHP cenderung mengalami pola yang sama dengan udang kontrol.

Dibandingkan dengan udang sehat, jumlah *Vibrio* pada udang EHP lebih tinggi (Gambar 2). Meningkatnya jumlah *Vibrio* pada udang terinfeksi EHP kemungkinan disebabkan oleh sistem imun udang yang menurun akibat infeksi EHP. Meski hepatopankreas tidak secara langsung terlibat dalam sistem imun, penurunan nutrisi dan energi akibat infeksi EHP menurunkan sistem pertahanan tubuh udang (Pascual *et al.*, 2006).

Hepatopankreas ditutup oleh selaput membran tipis, tersusun dari tubulus yang dihubungkan oleh jaringan ikat basofilik yang meningkatkan luas permukaan untuk pencernaan dan penyerapan. Setiap tubulus memiliki lumen pada bagian tengahnya dan dibatasi oleh epitel (Reantaso *et al.*, 2013).

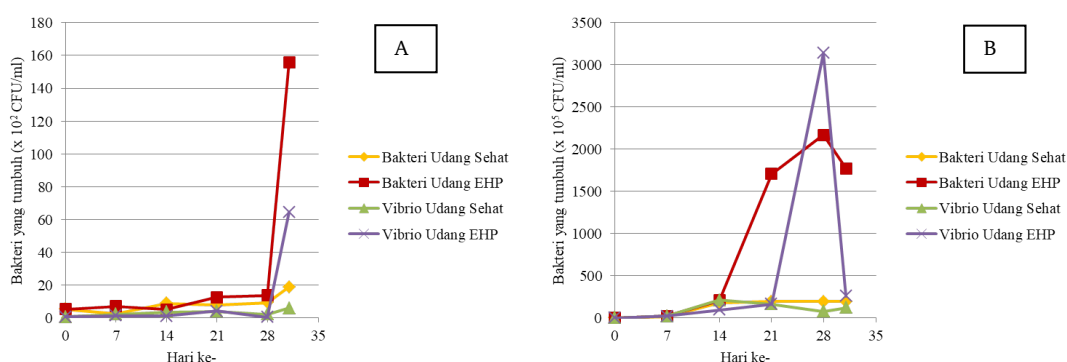


Gambar 2. Jumlah bakteri total dan terduga *Vibrio* dari hepatopankreas yang tumbuh pada media TSA+ dan TCBS.

EHP merupakan parasit obligat intraseluler yang menyerang hepatopankreas udang (Tourtip *et al.*, 2009). Dengan nutrisi dari sel hepatopankreas, spora EHP berproliferasi, menyebabkan sel inang membesar dan pecah. Sel inang yang pecah (lesi) sudah tidak terdapat pertahanan tubuh udang, sehingga menjadi tempat yang baik untuk *Vibrio* tumbuh (Tang *et al.*, 2017).

Umumnya, udang positif terinfeksi EHP setelah hari ke-20 *bioassay* kohabitasi

dilakukan (Jaroenlak *et al.*, 2018). Pada penelitian ini, infeksi EHP telah terjadi pada hari ke-21. Hal ini diperkuat dengan jumlah *Vibrio* pada air dan feses udang EHP yang mengalami perubahan pada hari ke-21 (Gambar 3). Hasil ini sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa jumlah *Vibrio* pada air dan feses menunjukkan kondisi yang terjadi pada udang, jumlah bakteri *Gammaproteobacteria* meningkat pada air udang sakit (Zheng *et al.*, 2017).

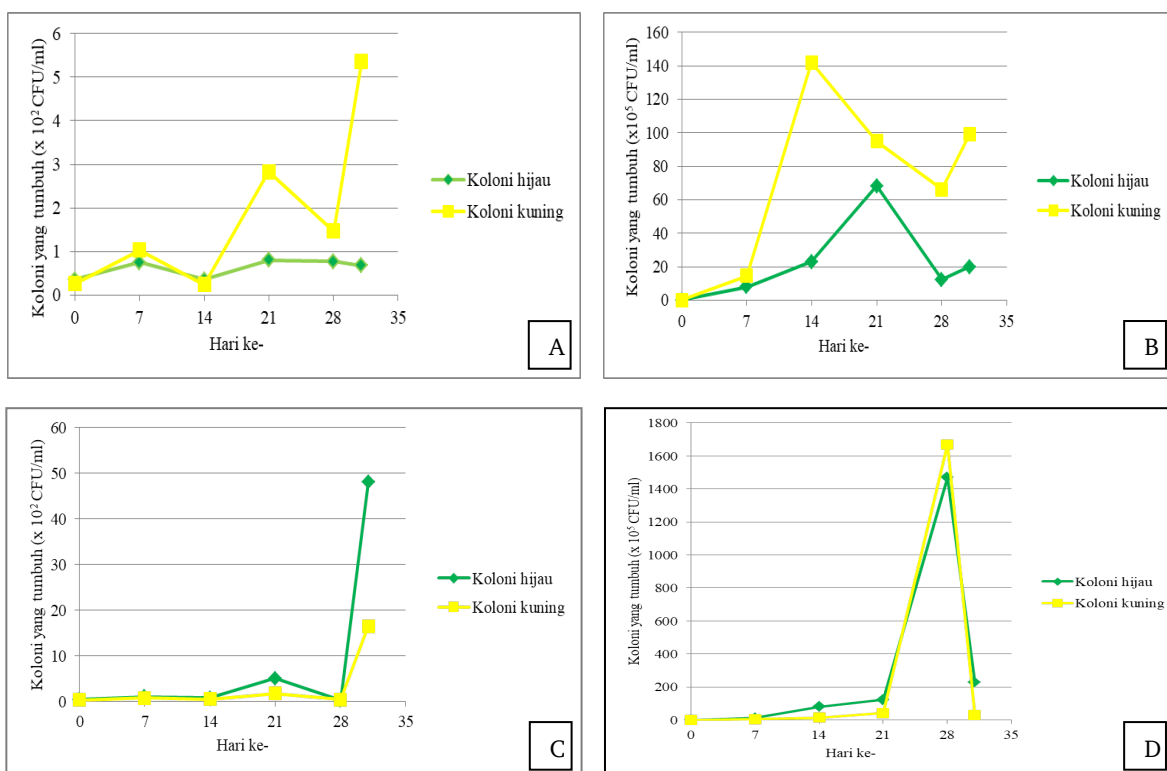


Gambar 3. (A) Jumlah bakteri total dan terduga *Vibrio* yang tubuh di air; (B) Jumlah bakteri total dan terduga *Vibrio* di feses yang tumbuh pada media TSA+ dan TCBS.

Jumlah *Vibrio* juga dihitung berdasarkan warna koloni. Pada media TCBS, terdapat dua warna koloni *Vibrio* yang muncul, yaitu hijau dan kuning. Perubahan warna dan jumlah koloni pada udang terinfeksi EHP terjadi pada air dan feses udang EHP. Air pada akuarium udang sehat memiliki jumlah koloni kuning lebih tinggi dari pada koloni hijau (Gambar 4A).

Air pada akuarium udang terinfeksi EHP memiliki jumlah koloni hijau yang

lebih tinggi dari pada koloni kuning (Gambar 4C). Feses udang sehat (kontrol) memiliki jumlah koloni kuning yang lebih tinggi dari pada koloni hijau (Gambar 4B). Berbeda dengan udang sehat, feses udang EHP memiliki jumlah koloni hijau yang lebih tinggi dari pada koloni kuning. Tetapi pada hari ke-28 jumlah koloni kuning lebih tinggi dari pada koloni hijau (Gambar 4D).



Gambar 4. Jumlah terduga *Vibrio* dari (A) air udang sehat; (B) feses udang sehat; (C) air udang EHP, dan (D) feses udang EHP pada media TCBS.

Bakteri *Vibrio* yang menyebabkan penyakit pada udang umumnya tidak dapat melakukan fermentasi sukrosa, sehingga menghasilkan warna hijau pada media TCBS (Lavilla-Pitogo dan Pena, 1998), seperti *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio campbellii*, *Vibrio tapetis*, *Vibrio harveyi*. *Vibrio parahaemolyticus* strain virulen dan *Vibrio campbellii* yang memiliki gen *pir^{VP}* dan menghasilkan toksin *pirA* dan *pirB* menyebabkan penyakit AHPND pada udang (Dong *et al.*, 2017). *Vibrio tapetis* menyebabkan *Brown Ring Disease* (Balboa *et al.*, 2012). *Vibrio harveyi* yang tidak berpendar (*non luminescence*) berasosiasi dengan penyakit *White Tail Disease* (Zhou *et al.*, 2012).

Karakterisasi Isolat *Vibrio*

Pada media TCBS, koloni *Vibrio* berwarna hijau dan kuning, diameter koloni 1-4 mm, berbentuk bulat dan tidak beraturan, elevasi cembung dan pinggiran halus. Pada media TSA+, koloni *Vibrio* berwarna putih kekuningan, dan pinggiran koloni yang halus. Morfologi dan warna koloni *Vibrio* pada penelitian

ini sesuai dengan ciri koloni *Vibrio* pada penelitian sebelumnya (Gomez-Gil *et al.*, 2014). Uji katalase pada isolat *Vibrio* memberikan hasil positif pada 83 isolat dan 26 isolat *Vibrio* lainnya menunjukkan hasil negatif. Uji positif katalase ditunjukkan dengan adanya gelembung. Gelembung yang dihasilkan adalah hasil konversi enzim katalase dari hidrogen peroksida menjadi oksigen (Barton dan McLean, 2019). Uji gram menggunakan KOH 3% menunjukkan bahwa isolat *Vibrio* merupakan bakteri gram negatif. Setelah ditambahkan KOH 3%, semua isolat (109 isolat) menunjukkan adanya benang yang kental. Benang kental dapat terbentuk karena dinding sel bakteri gram negatif yang lisis dan keluarnya DNA bakteri (Clontz, 2009).

Seluruh isolat *Vibrio* menunjukkan hasil positif pada uji oksidase. Isolat *Vibrio* memiliki enzim sitokrom oksidase yang dapat mengoksidasi reagen oksidase, tetrametil-p-fenilendiamin-dihidroklorida dan membentuk produk indofenol yang berwarna ungu (Csuros dan Csuros, 1999). Selain uji gram dan oksidase,

seluruh isolat *Vibrio* menunjukkan hasil positif pada uji oksidatif glukosa. Media oksidatif glukosa berwarna hijau karena terdapat indikator pH bromotimol biru. Setelah diinokulasikan dengan isolat *Vibrio* dan diinkubasi selama 18-24 jam, media menjadi berwarna kuning. Isolat *Vibrio* menghasilkan asam sehingga pH media menjadi turun. Pada pH asam bromotimol biru berubah warna dari hijau menjadi kuning (Ramakrishnan dan Sulochana, 2012). Seluruh isolat *Vibrio* menunjukkan hasil positif pada uji gram dengan KOH 3%, uji oksidase dan oksidasi glukosa, sesuai dengan literatur yang ditulis oleh Holt *et al.* (1994) dan Parija (2012).

Analisis Hasil ERIC CR dan Konstruksi Pohon Filogenetik

Isolat *Vibrio* yang berhasil diekstraksi dan dilanjutkan dengan ERIC PCR sebanyak 109 isolat, dengan jumlah koloni dari hepatopankreas udang sehat sebanyak 11 isolat, air udang sehat

sebanyak 22 isolat, dan feses udang sehat sebanyak 31 isolat. Hepatopankreas udang EHP yang berhasil dilakukan ERIC PCR sebanyak 6 isolat, air udang EHP 15 isolat dan feses udang EHP sebanyak 24 isolat.

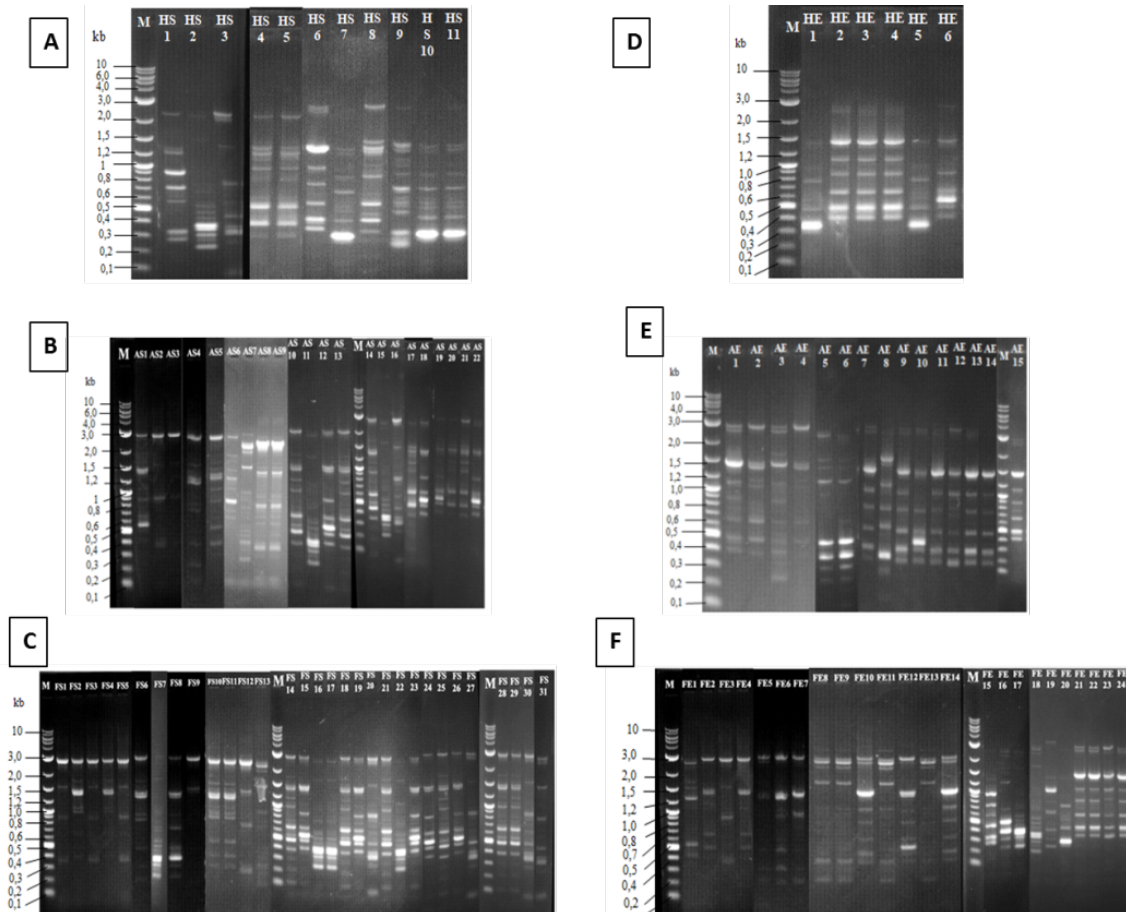
Sebanyak 109 isolat *Vibrio* berhasil diamplifikasi dengan primer ERIC 1R dan 2F. Fragmen DNA bakteri *Vibrio* hasil ERIC PCR berkisar antara 3-8 pita. Fragmen DNA hasil ERIC-PCR memiliki ukuran yang bervariasi antara 3 kb sampai dengan 0.2 kb. ERIC PCR dapat menghasilkan pita/*band* sebanyak 3-15 dengan ukuran dari 0.1-5 kb (Zulkifli *et al.*, 2009). Fragmen ERIC yang sering ditemukan pada isolat *Vibrio* sebanyak satu pita/*band*, pada 3 kb. Pada hepatopankreas udang sehat dan EHP, fragmen ERIC sering ditemukan pada band 1.2-1.5 kb. Fragmen ERIC yang sering ditemukan pada isolat *Vibrio* dari air udang sehat dan EHP adalah 3 kb. Sedangkan pada feses udang sehat dan EHP pada pita/*band* ukuran 1.2-1.5 dan 3 kb.

Tabel 2. Sumber dan jumlah koloni *Vibrio* yang dilakukan ERIC PCR.

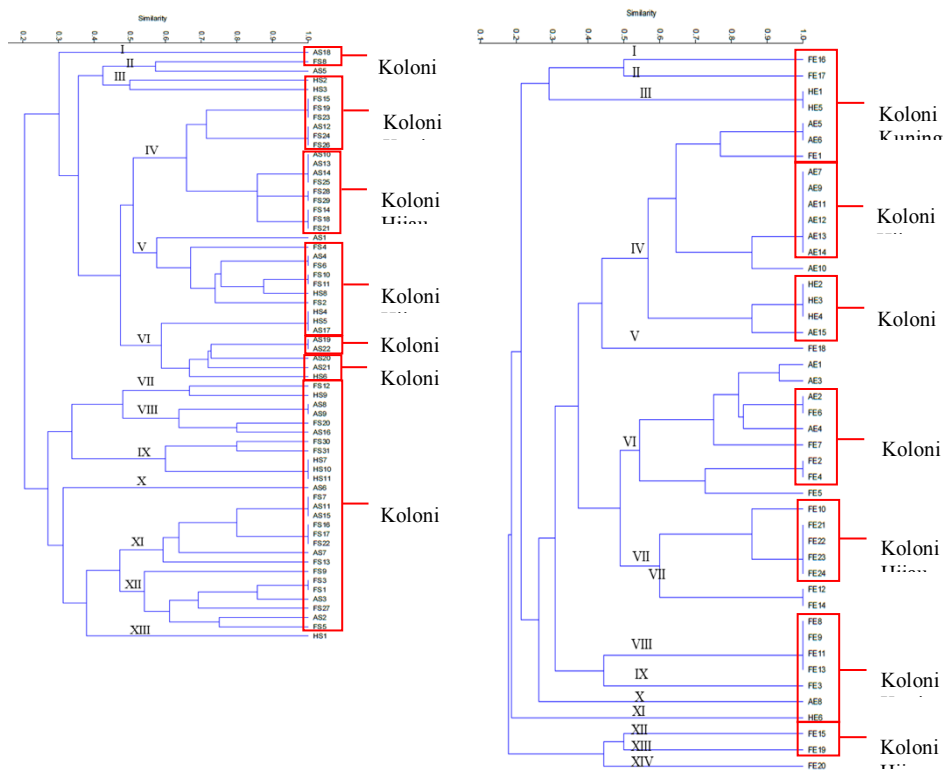
Sumber isolat	Jumlah koloni kuning	Jumlah koloni hijau	Total koloni
Hepatopankreas udang sehat (HS)	6	5	11
Air udang sehat (AS)	14	8	22
Feses udang sehat (FS)	20	11	31
Hepatopankreas udang EHP (HE)	3	3	6
Air udang EHP (AE)	5	10	15
Feses udang EHP (FE)	12	12	24
Jumlah keseluruhan			109

Visualisasi hasil ERIC PCR menunjukkan bahwa isolat *Vibrio* baik dari udang sehat maupun udang terinfeksi EHP memiliki profil ERIC yang beragam. Pohon filogenetik hasil ERIC PCR berhasil dikonstruksi berdasarkan sumber bakteri *Vibrio*, hepatopankreas, air dan feses. Konstruksi pohon filogenetik menggunakan program Past3, dengan koefisien *Dice Similarity* dan UPGMA (Maluping *et al.*, 2005).

Perbedaan jumlah dan ukuran dari hasil ERIC PCR menunjukkan keanekaragaman genetik dari isolat bakteri (Meacham *et al.*, 2003). Pohon filogenetik hasil ERIC PCR menunjukkan kekerabatan isolat *Vibrio* dari air, feses, hepatopankreas, udang sehat dan udang EHP. *Clustering* pada pohon filogenetik dilakukan berdasarkan tingkat kemiripan 50% (0.5 *similarity*) (Pusparini *et al.*, 2018).



Gambar 5. Visualisasi gel agarosa 1.2% hasil ERIC PCR dari (A) hepatopankreas udang sehat, (B) air udang sehat, (C) feses udang sehat, (D) hepatopankreas udang EHP, (E) air udang EHP, (F) feses udang EHP.



Gambar 6. Konstruksi pohon filogenetik (A) *Vibrio* udang sehat dan (B) *Vibrio* udang EHP.

Pada udang sehat terdapat 64 isolat yang berhasil dilakukan ERIC PCR. Dari 64 isolat, terbagi menjadi 13 kluster dan 41 pola yang berbeda (Gambar 6A). Bakteri *Vibrio* pada udang EHP berhasil diisolasi sebanyak 45 isolat. Pohon filogenetik berhasil dikonstruksi dengan 14 kluster dan 27 pola yang berbeda (Gambar 6B). Berdasarkan hasil konstruksi pohon filo-genetik, isolat *Vibrio* ditemukan menge-lompok berdasarkan warna koloni. Pada udang sehat dan udang EHP, terdapat 7 kelompok *Vibrio* berdasarkan warna koloni hijau dan kuning. Penambahan kluster pada udang yang terinfeksi EHP disebabkan karena terjadinya dominansi *Vibrio* yang patogen.

Vibrio merupakan bakteri patogen oportunistis pada udang. *Vibrio* dapat menjadi patogen ketika udang sedang tidak sehat, seperti adanya luka, terinfeksi penyakit atau terjadi infeksi sebelumnya (Brown *et al.*, 2012). Pada udang yang tidak sehat, keberadaan *Vibrio* yang patogen dapat menjadi lebih banyak dan lebih dominan. Umumnya *Vibrio* yang patogen tidak dapat melakukan fermentasi sukrosa, pada media TCBS menunjukkan koloni berwarna hijau (Lavilla-Pitogo dan de la Peña, 1998). *Vibrio* dapat bersifat dominan disebabkan oleh kemampuan *Vibrio* dalam melakukan *quorum sensing*, adhesi, kolonisasi, dan infeksi terhadap host (Austin dan Zhang, 2006).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil yang telah disampaikan dapat disimpulkan bahwa metode ERIC PCR cukup efektif untuk menganalisis keanekaragaman bakteri *Vibrio* secara cepat. Jumlah bakteri *Vibrio* pada udang terinfeksi EHP lebih tinggi dibandingkan udang sehat namun keanekaragamannya lebih rendah dibandingkan udang sehat. Hal ini menunjukkan adanya dominansi spesies tertentu. Penelitian lebih lanjut terhadap jenis spesies tiap isolat bakteri dapat dilakukan dengan metode sekuensing untuk mendapatkan gambaran lebih jelas

dan ciri isolat yang lebih detail. Namun penggunaan ERIC PCR dapat dijadikan salah satu metode alternatif yang cepat dan murah pada diagnosa penyakit infeksi EHP.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada seluruh pihak yang mendukung kelancaran penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Aranguren, L.F., Han, J.E. dan Tang, K.F.J., 2017. Enterocytozoon hepatopenaei (EHP) is a risk factor for acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) and septic hepatopancreatic necrosis (SHPN) in the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 471, pp.37-42. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.12.038>.
- Asgarani, E., Ghashghaei, T., Soudi, M. R. dan Alimadadi, N., 2015. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) PCR based genetic diversity of *Xanthomonas* spp. and its relation to xanthan production. *Iranian Journal of Microbiology*, 7(1), pp. 38-44. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4670466/>
- Austin, B. dan Zhang, X.H., 2006. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in Applied Microbiology*, 43(2), pp.119-124. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01989.x>.
- Balboa, S., Dieguez, A.L., Doce, A., Barja, J.L. dan Romalde, J.L., 2012. Evaluation of different culture media for the isolation and growth of the fastidious *Vibrio tapetis*, the causative agent of brown ring disease. *Journal of invertebrate pathology*, 111(1), pp.74-81. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.06.007>.
- Barton, L.L. dan McLean, R.J.C., 2019. *Environmental Microbiology and*

- Microbial Ecology*. John Wiley & Sons, Inc. USA. p.445.
- Bilung, L.M., Pui, C.F., Su'ut, L. dan Apun, K., 2018. Evaluation of BOX-PCR and ERIC-PCR as molecular typing tools for pathogenic *Leptospira*. *Disease Markers*, 2018, pp.1-10. <https://doi.org/10.1155/2018/1351634>.
- Brown, S.P., Cornforth, D.M. dan Mideo, N., 2012. Evolution of virulence in opportunistic pathogens: generalism, plasticity, and control. *Trends in microbiology*, 20(7), pp.336-342. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.04.005>.
- Clontz, L., 2009. *Microbial Limit and Bioburden Test Validation Approaches and Global Requirements Second Edition*. CRC Press. USA. p.326.
- Csuros, M. dan Csuros, C., 1999. *Microbial Examination of Water and Wastewater*. CRC Press. USA. p.364.
- Dong, X., Wang, H., Xie, G., Zou, P., Guo, C., Liang, Y. dan Huang, J., 2017. An isolate of *Vibrio campbellii* carrying the *pir^{VP}* gen causes acute hepatopancreatic necrosis disease. *Emerging Microbes & Infections*, 6(1), pp.1-3. <https://doi.org/10.1038/emi.2016.131>.
- Feng, B., Liu, H., Wang, M., Sun, X., Pan, Y. dan Zhao, Y., 2017. Diversity analysis of acute hepatopancreatic necrosis disease-positive *Vibrio parahaemolyticus* strains. *Aquaculture and Fisheries*, 2(6), pp.278-285. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2017.10.001>.
- Gomez-Gil, B., Thompson, C., Matsumura, Y., Sawabe, T., Iida, T., Christen, R. dan Thompson, F., 2014. *The Family Vibrionaceae, The prokaryotes*. Springer, Berlin: Heidelberg. pp.659-747.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. dan Williams, S.T., 1994. *Bergey's Manual of Determinate Bacteriology Ninth Edition*. Lippincott Williams & Wilkins. USA. p.787.
- Itsathitphaisarn, O., Thitamadee, S., Weerachatanukul, W. dan Sritunyalucksana, K., 2017. Potential of RNAi applications to control viral diseases of farmed shrimp. *Journal of invertebrate pathology*, 147, pp.76-85. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.11.006>
- Jaroenlak, P., Boakye, D.M., Vanichviriyakit, R., Williams, B.A.P., Sritunyalucksana, K. dan Itsathitphaisarn, P., 2018. Identification, characterization and heparin binding capacity of a spore-wall, virulence protein from the shrimp microsporidian, *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP). *Parasites & Vectors*, 11 (177), pp.2-15. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2758-z>.
- Lavilla-Pitogo, C.R. dan de la Peña, L.D., 1998. Bacterial diseases in tiger shrimp culture in the Philippines. *SEAFDEC Asian Aquaculture*, 20(5), pp.6-7, 10, 32-33. <http://repository.seafdec.org.ph/handle/10862/2883>.
- Maluping, R.P., Ravelo, C., Lavilla-Pitogo, C.R., Krovacek, K. dan Romalde, J.L., 2005. Molecular typing of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from the Philippines by PCR-based methods. *Journal of applied microbiology*, 99(2), pp.383-391. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02571.x>.
- Meacham, K.J., Zhang, L., Foxman, B., Bauer, R.J. dan Marrs, C.F., 2003. Evaluation of genotyping large numbers of *Escherichia coli* isolates by enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR. *Journal of clinical microbiology*, 41(11), pp.5224-5226. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.11.5224-5226.2003>.
- Newman, S.G., 2015. Microsporidian impacts shrimp production-industry efforts address control,

- not eradication. *Global Aquaculture Advocate*, pp.33-35.
- Parija, S.C., 2012. *Textbook of Microbiology and Immunology 2nd Edition*. Elsevier. Manesar. p.684.
- Pascual, C., Ariadna, S., Edgar, Z., Gerard, C., Gaxiola, G., Roberto, B., Rolando, G., Enrique, H. dan Carlos, R., 2006. Biochemical, physiological, and immunological changes during starvation in juveniles of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 25(1), pp.416-429. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.06.001>.
- Pusat Data Statistik, Kementerian Kelautan dan Perikanan (Sidatik), 2018. *Dashboard Produksi Perikanan dan Kelautan Satu Data – Kementerian Kelautan dan Perikanan*. Website https://satudata.kkp.go.id/dashboard_produk.
- Pusparini, N., Waturangi, D.E., Usia, T. dan Nikastri, E., 2018. Genetic diversity of *Escherichia coli* isolated from ice cube production sites. *BMC research notes*, 11(1), pp.1-8. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3737-3>.
- Rajendran, K.V., Shivam, S., Praveena, P.E., Rajan, J.J.S., Kumar, T.S., Avunje, S., Jagadeesan, V., Babu, S.P., Pande, A., Krishnan, A.N. dan Alavandi, S.V., 2016. Emergence of Enterocytozoon hepatopenaei (EHP) in farmed *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* in India. *Aquaculture*, 454, pp.272-280. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.12.034>.
- Ramakrishnan, S. dan Sulochana, K.N., 2012. *Manual of Medical Laboratory Techniques*. Jaypee Brothers Medical Publishers. New Delhi. p.453.
- Reantaso, M.B., Tran, L. dan Hue, D.T.T., 2013. What happens when hepatopancreas – shrimp's main organ for food absorption, digestion and storage – becomes infected by a pathogen?. *FAO Aquaculture Newsletter*, 51, p.37-39.
- Sechi, L.A., Zanetti, S., Dupré, I., Delogu, G., dan Fadda, G., 1998. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequences as molecular targets for typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Journal Of Clinical Microbiology*, 36(1), p.128-132. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.1.128-132.1998>
- Selvin, J., Ninawe, A.S., Meenatchi, R. dan Kiran, G.S., 2015. Control of pathogenic Vibrios in shrimp aquaculture using antiinfectives from marine natural products. *Nutrición Acuicola: Investigación y Desarrollo*, p.102-141. <http://nutricionacuicola.uanl.mx/index.php/acu/article/view/37>.
- Sharples, G.J. dan Lloyd, R.G., 1990. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. *Nucleic acids research*, 18(22), pp.6503-6508. <https://doi.org/10.1093/nar/18.22.6503>.
- Tang, K.F., Aranguren, L.F., Piamsomboon, P., Han, J.E., Maskaykina, I.Y. dan Schmidt, M.M., 2017. Detection of the microsporidian Enterocytozoon hepatopenaei (EHP) and Taura syndrome virus in *Penaeus vannamei* cultured in Venezuela. *Aquaculture*, 480, pp.17-21. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.07.043>.
- Tourtip, S., Wongtripop, S., Stentiford, G.D., Bateman, K.S., Sriurairatana, S., Chavadej, J., Sritunyalucksana, K. dan Withyachumnarnkul, B., 2009. Enterocytozoon hepatopenaei sp. nov. (Microsporida: Enterocytozoonidae), a parasite of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda: Penaeidae): Fine structure and phylogenetic relationships. *Journal of invertebrate pathology*, 102(1), pp.21-29. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.004>.

- Waturangi, D.E., Joanito, I., Yogi, Y. dan Thomas, S., 2012. Use of REP- and ERIC-PCR to reveal genetic heterogeneity of *Vibrio cholerae* from edible ice in Jakarta, Indonesia. *Gut Pathogens*, 4(1), pp.1-9. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-4-2>.
- Wong, H.C. dan Lin, C.H., 2001. Evaluation of typing of *Vibrio parahaemolyticus* by three PCR methods using specific primers. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(12), pp.4233-4240. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.12.4233-4240.2001>.
- Zheng, Y., Yu, M., Liu, J., Qiao, Y., Wang, L., Li, Z., Zhang, X.H. dan Yu, M., 2017. Bacterial community associated with healthy and diseased Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae and rearing water across different growth stages. *Frontiers in microbiology*, 8(1362), pp.1-11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01362>.
- Zhou, J., Fang, W., Yang, X., Zhou, S., Hu, L., Li, X., Qi, X., Su, H., dan Xie, L., 2012. A nonluminescent and highly virulent *Vibrio harveyi* strains is associated with "Bacterial White Tail Disease" of *Litopenaeus vannamei* Shrimp. *Plos One*, 7(2), pp.1-6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029961>.
- Zulkifli, Y., Alitheen, N.B., Son, R., Raha, A.R., Samuel, L., Yeap, S.K. dan Nishibuchi, M., 2009. Random amplified polymorphic DNA-PCR and ERIC PCR analysis on *Vibrio parahaemolyticus* isolated from cockles in Padang, Indonesia. *International Food Research Journal*, 16(2), pp.141-150. <http://www.ifrj.upm.edu.my/volume-16-2009.html>.