

Optimasi *Duplex* PCR untuk Deteksi Simultan Gen Penyandi Faktor Virulensi *ompW* dan *ctxA* *Vibrio cholerae*

(*DUPLEX PCR OPTIMIZATION FOR SIMULTANEOUS DETECTION OF GENES
ENCODING VIRULENCE FACTORS ompW AND ctxA Vibrio cholerae*)

Rian Ka Praja¹, I Dewa Made Sukrama², Ni Nengah Dwi Fatmawati², Wahyu Hidayati²

¹Mahasiswa Magister Ilmu Biomedik, Program Pascasarjana Universitas Udayana

²Bagian Mikrobiologi Klinik, Fakultas Kedokteran Universitas Udayana

Jl. P.B. Sudirman, Denpasar, Bali

E-mail: riankapraja@gmail.com

ABSTRAK

Vibrio cholerae merupakan salah satu agen *foodborne disease* yang dapat ditularkan melalui *seafood*. Penelitian ini bertujuan untuk optimasi gen penyandi faktor virulensi *outer membrane protein W (ompW)* dan *cholerae toxin subunit A (ctxA)* menggunakan teknik *Duplex Polymerase Chain Reaction (dPCR)*. Dua bakteri *V. cholerae* O1 serotipe Ogawa dan Inaba digunakan pada penelitian ini. Proses isolasi DNA dilakukan menggunakan metode *Boil Cell Extraction (BCE)*. dPCR dilakukan menggunakan dua pasang primer (*forward* dan *reverse*) *ompW-F*, *ompW-R* dan *ctxA-F*, *ctxA-R* dengan panjang produk masing-masing 588 bp dan 302 bp. Tahap optimasi yang dilakukan dalam proses dPCR ini meliputi variasi suhu *annealing*, variasi konsentrasi primer serta variasi volume DNA *template* kemudian deteksi produk dPCR dilakukan dengan elektroforesis pada gel agarosa 1,5% dan divisualisasi menggunakan alat Gel DocTM XR (Bio-Rad). Hasil penelitian menunjukkan komposisi reaksi dPCR yang terbaik untuk mendeteksi gen *ompW* dan *ctxA* secara simultan terdiri dari PCR mix (Promega) 12,5 µL, primer *ompW-F*, *ompW-R* 0,5 µM, primer *ctxA-F*, *ctxA-R* 0,3 µM, *nuclease free water* 6,5 µL dan DNA *template* 2 µL sehingga volume total menjadi 25 µL. Kondisi mesin PCR terdiri dari pre-denaturasi 95°C selama 2 menit (1 siklus) diikuti oleh denaturasi 95°C selama 1 menit, *annealing* 53°C selama 1 menit, *extension* 72°C selama 1 menit (35 siklus), dan *post-extension* 72°C selama 5 menit (1 siklus). Dapat disimpulkan bahwa dPCR dapat digunakan untuk deteksi simultan gen penyandi faktor virulensi *ompW* dan *ctxA* *V. cholerae*.

Kata kunci : *Vibrio cholerae*, *Duplex Polymerase Chain Reaction (dPCR)*, *outer membrane protein W (ompW)*, *cholerae toxin subunit A (ctxA)*, *Boil Cell Extraction (BCE)*.

ABSTRACT

Vibrio cholerae is one of foodborne disease agents that can be transmitted through seafood. This study aims to find optimization of genes encoding virulence factors outer membrane protein W (*ompW*) and cholerae toxin subunit A (*ctxA*) using Duplex Polymerase Chain Reaction (dPCR) techniques. Two bacterium *V. cholerae* O1 serotype Ogawa and Inaba used in this study. DNA isolation process is done using Boil Cell Extraction (BCE) method. dPCR conducted using two primer pairs (forward and reverse) *ompW-F*, *ompW-R* and *ctxA-F*, *ctxA-R* with length of each product 588 bp and 302 bp. Optimizations performed in dPCR processes include variations in annealing temperature, variations in the concentration of primer, and variations in DNA volume then dPCR product detection is done by electrophoresis on 1.5% agarose gel and visualized using Gel DocTM XR (Bio-Rad). The results showed that the best composition dPCR to detect *ompW* and *ctxA* simultaneously consists of 12.5 µL PCR mix (Promega), 0.5 µM primer *ompW-F*, *ompW-R*, 0.3 µM primer *ctxA-F*, *ctxA-R*, 6.5 µL nuclease free water and 2 µL DNA so that the total volume to 25 µL.

PCR program consists of pre-denaturation 95°C for 2 min (1 cycle) followed by denaturation 95°C for 1 min, annealing 53°C for 1 min, extension 72°C for 1 min (35 cycles), and post-extension 72°C for 5 minutes (1 cycle). It can be concluded that dPCR can be used for the simultaneous detection of genes encoding virulence factors *ompW* and *ctxA* *V. cholerae*.

Keywords : *Vibrio cholerae*, Duplex Polymerase Chain Reaction (dPCR), outer membrane protein W (*ompW*), cholerae toxin subunit A (*ctxA*), Boil Cell Extraction (BCE).

PENDAHULUAN

Kolera merupakan suatu sindrom epidemiologik klinis yang disebabkan oleh *Vibrio cholerae*. Keadaan yang berat pada penyakit ini ditandai oleh diare yang hebat dengan tinja menyerupai air cucian beras (*rice water*) dan cepat menimbulkan dehidrasi (Lesmana, 2004). Kolera merupakan masalah utama kesehatan masyarakat terutama di negara berkembang seperti Afrika, Asia, dan Amerika Selatan walaupun secara epidemiologi dan bakteriologi penyakit kolera sudah diketahui sejak abad yang lalu (Lesmana, 2004; Ryan and Ray, 2004).

Penyebaran kolera umumnya melalui air minum yang terkontaminasi, tetapi penelitian akhir-akhir ini menunjukkan bahwa *seafood* seperti kerang, tiram, remis, udang dan kepiting dapat juga menjadi sumber penularan yang penting untuk infeksi *V. cholerae* (Chen *et al.*, 2004; Hill *et al.*, 2011; Sathiyamurthy *et al.*, 2013). Beberapa dari jenis hewan laut ini bahkan hidup jauh di tengah laut. Ini menandakan bahwa *Vibrio* dapat mempertahankan siklus hidupnya tanpa harus melalui ekskreta manusia secara terus menerus (Lesmana, 2004).

Vibrio cholerae memiliki beberapa faktor virulensi diantaranya *outer membrane protein W (ompW)* dan *cholerae toxin (ctx)*. *ompW* berperan sebagai *protective barrier* bakteri *V. cholerae* dari lingkungannya dan dapat juga digunakan sebagai penanda spesies spesifik dari *V. cholerae* (Nandi *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2002; Alizadeh *et al.*, 2013). *Cholerae toxin* merupakan enterotoksin yang bertanggung jawab terhadap kejadian diare yang diproduksi oleh *V. cholerae* patogen. *Cholerae toxin* disandi oleh gen *ctx* yang terdiri dari dua subunit yaitu subunit A dan B (Maheshwari *et al.*, 2011; Brooks *et al.*, 2013; Dalusi *et al.*, 2015).

Duplex PCR merupakan pengembangan dari PCR yang dapat digunakan untuk mendeteksi dua jenis gen dalam satu kali *running*. Metode ini lebih praktis, hemat waktu, dan biaya jika dibandingkan dengan *single PCR* atau *uniplex PCR*. Beberapa peneliti telah menggunakan teknik dPCR untuk deteksi patogen, misalnya Yasmon *et al.* (2010) menggunakan dPCR untuk deteksi secara simultan *Legionella species* dan *Legionella pneumophila* pada sampel air di Jakarta. Thanananta and Thanananta (2008) mendeteksi *E. coli* yang berasal dari air menggunakan dPCR dengan target gen *lacZ* dan *uidA*.

Penelitian mengenai kontaminasi *V. cholerae* patogen yang membawa gen penyandi faktor virulensi pada makanan sangat penting untuk dilakukan dalam rangka mencegah terjadinya wabah di kemudian hari (Waturangi *et al.*, 2013). Penelitian menggunakan teknik molekuler untuk mendeteksi faktor virulensi yang dimiliki oleh *V. cholerae* diawali dengan mencari primer yang sesuai kemudian dilanjutkan dengan optimasi PCR. Secara umum optimasi proses PCR dapat dilakukan dengan cara memvariasikan kondisi yang digunakan pada proses PCR tersebut (Handoyo dan Ari, 2000). Penelitian ini bertujuan untuk mengoptimasi dPCR dengan berbagai variasi suhu *annealing*, variasi konsentrasi primer serta variasi volume DNA *template* untuk mendapatkan hasil amplifikasi gen *ompW* dan *ctxA* *V. cholerae* yang optimal.

METODE PENELITIAN

Bakteri kontrol yang digunakan untuk optimasi dPCR pada penelitian ini adalah *V. cholerae* O1 serotipe Ogawa dan Inaba. Penelitian diawali dengan isolasi DNA genom menggunakan metode *Boil Cell Extraction* (BCE) yang diadaptasi dari Marlina *et al.* (2007) dengan modifikasi. Koloni bakteri dimasukkan ke dalam 200 µl TE. Kemudian dipanaskan selama 10 menit pada suhu 100°C. Selanjutnya didinginkan menggunakan es selama 1-3 menit kemudian disentrifugasi 8.000 rpm selama 1 menit. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung *ependorf* baru dan disimpan pada suhu -80°C hingga digunakan.

Reaksi dPCR dilakukan menggunakan primer *ompW* dan *ctxA* (*forward* dan *reverse*) yang dicampurkan dengan PCR mix (Promega), *nuclease free water* dan DNA *template*. Optimasi awal dilakukan dengan menggunakan *uniplex* PCR untuk menentukan suhu *annealing* optimum masing-masing primer kemudian dilanjutkan dengan optimasi dPCR. Mesin PCR diprogram dengan kondisi pre-denaturasi 95°C selama 2 menit (1 siklus) diikuti denaturasi 95°C selama 1 menit, *annealing* selama 1 menit dengan variasi suhu 50°C dan 53°C, *extension* 72°C selama 1 menit (35 siklus), dan *post-extension* 72°C selama 5 menit (1 siklus). Sekuens primer yang digunakan terdapat pada tabel di bawah ini.

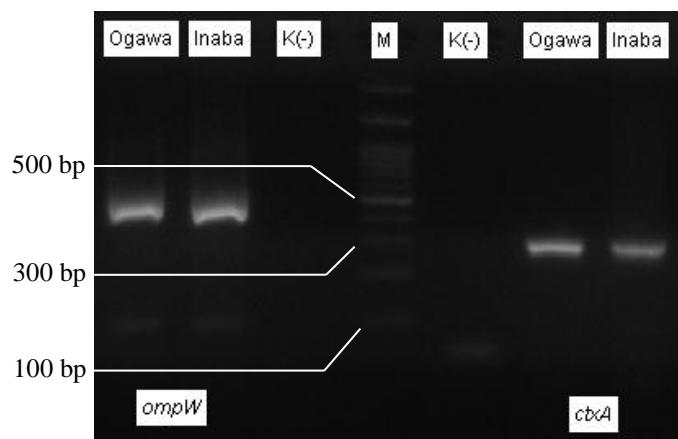
Tabel 1. Sekuens primer *ompW* dan *ctxA*

Target	Primer	Sekuens (5'-3')	Amplikon	Referensi
<i>ompW</i>	ompW-F	CACCAAGAAGGTGACTTTATTGTG	588 bp	Nandi <i>et al.</i> , 2000
	ompW-R	GAACTTATAACCACCCGCG		
<i>ctxA</i>	ctxA-F	CTCAGACGGGATTTGTTAGGCACG	302 bp	Shirai <i>et al.</i> , 1991
	ctxA-R	TCTATCTCTGTAGCCCCTATTACG		

Elektroforesis dilakukan menggunakan gel agarose 1,5 % yang ditambahkan 1 µL *Biotium Gel RedTM Nucleic Acid*. Elektroforesis menggunakan TBE 0,5 X pada tegangan 50 volt selama 60 menit selanjutnya divisualisasi menggunakan Gel DocTM XR (Bio-Rad). Ukuran pita yang terbentuk dibandingkan dengan DNA *ladder* 100 bp.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimasi PCR tahap awal dilakukan menggunakan teknik *uniplex* PCR untuk masing-masing primer dengan kondisi PCR suhu *annealing* 50°C selama 1 menit, primer ompW-F dan ompW-R 0,5 µM, PCR Mix (Promega) 12,5 µL, *nuclease free water* 8 µL dan DNA *template* 2 µL sehingga volume total menjadi 25 µL. Komposisi reaksi yang sama juga diberlakukan pada primer ctxA-F dan ctxA-R. Elektroforegram hasil optimasi tahap I dapat dilihat pada Gambar 1. di bawah ini.



Gambar 1. Elektroforegram optimasi tahap I

Keterangan : K(-) = Kontrol negatif, M = Marker 100 bp DNA *ladder*, *ompW* = *outer membrane protein W*, *ctxA* = *cholerae toxin subunit A*.

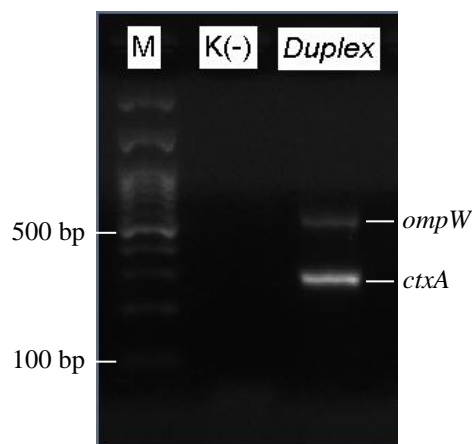
Pada optimasi tahap I telah berhasil dilakukan amplifikasi terhadap gen *ompW* dan *ctxA*, hasil amplifikasi gen *ctxA* sesuai dengan ukuran amplikon yang diharapkan yaitu sebesar 302 bp namun ditemukan ketidaksesuaian pada ukuran amplikon gen *ompW* yang seharusnya berukuran 588 bp tetapi pitanya berada pada ± 400 bp bila dibandingkan dengan

DNA *ladder* 100 bp dan ditemukan pita non-spesifik yang ukurannya sangat kecil. Ukuran amplicon yang tidak sesuai ini kemungkinan disebabkan karena rasio yang tidak sesuai antara primer dan DNA *template* (Ali *et al.*, 2006).

Meskipun ukuran amplicon gen *ompW* belum sesuai tetapi bisa dipastikan bahwa pita tersebut adalah amplicon dari gen *ompW*. Hal ini dikarenakan sebelum primer disintesis untuk digunakan mengamplifikasi gen *ompW* dan *ctxA*, sebelumnya dilakukan konfirmasi terhadap sekuens primer tersebut menggunakan *software* bioinformatika BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) pada *Gen Bank* NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) untuk memastikan apakah primer tersebut memang ditujukan untuk mengamplifikasi gen target *ompW* dan *ctxA* serta mengkonfirmasi panjang produk amplifikasi yang dihasilkan.

Keberadaan pita non-spesifik pada hasil PCR dapat dikarenakan suhu *annealing* yang rendah. Amplifikasi akan lebih efisien jika dilakukan pada suhu yang lebih rendah, tetapi biasanya akan terjadi *mispriming* yaitu penempelan primer pada tempat yang salah (Yuwono, 2006). Untuk mengatasi masalah yang muncul ini dapat dilakukan optimasi ulang dengan meningkatkan suhu *annealing* PCR yang digunakan.

Setelah mengetahui *V. cholerae* O1 serotipe Ogawa dan Inaba tersebut membawa gen penyandi faktor virulensi *ompW* dan *ctxA*, optimasi dilanjutkan dengan menggabungkan kedua pasang primer tersebut ke dalam satu reaksi dengan meningkatkan suhu *annealing* menjadi 53°C. Dalam hal ini PCR yang dilakukan adalah dPCR. Komposisi reaksi dPCR terdiri dari PCR mix (Promega) 12,5 µL, primer *ompW*-F, *ompW*-R 0,5 µM, primer *ctxA*-F, *ctxA*-R 0,3 µM, *nuclease free water* 6,5 µL dan DNA *template* 2 µL sehingga volume total menjadi 25 µL. Elektroforegram hasil optimasi dPCR tahap II dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Elektroforegram optimasi tahap II
Keterangan : M = Marker 100 bp DNA *ladder*, K(-) = Kontrol negatif

Pada optimasi tahap II telah berhasil dilakukan amplifikasi gen *ompW* dan *ctxA* secara simultan menggunakan dPCR di dalam satu *mix* reaksi yang sama sehingga akan muncul dua pita pada satu *lane*. Pada tahap ini tidak ditemukan pita non-spesifik yang berukuran kecil dan ukuran amplicon untuk masing-masing gen *ompW* dan *ctxA* sudah sesuai. Hasil yang sesuai ini disebabkan karena peningkatan suhu *annealing*, kesesuaian konsentrasi primer, dan volume DNA *template*. Yuwono (2006) menyatakan pada suhu *annealing* yang lebih tinggi, spesifisitas reaksi amplifikasi akan meningkat. Konsentrasi primer untuk mengamplifikasi gen *ctxA* lebih rendah dibandingkan dengan konsentrasi primer untuk mengamplifikasi gen *ompW*, hal ini dikarenakan ukuran amplicon gen *ctxA* lebih kecil (302 bp) dibandingkan dengan *ompW* (588 bp). Konsentrasi kedua pasang primer ini sudah dianggap tepat karena menghasilkan pita yang sesuai. Menurut Padmalatha dan Prasad (2006) dan Harini *et al.* (2008) konsentrasi primer yang terlalu rendah atau yang terlalu tinggi dapat menyebabkan tidak terjadinya proses amplifikasi.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa dPCR dapat digunakan untuk deteksi simultan gen penyandi faktor virulensi *ompW* dan *ctxA* *V. cholerae*.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mendeteksi keberadaan kontaminasi *V. cholerae* yang membawa gen penyandi faktor virulensi pada makanan setelah dilakukan optimasi dPCR untuk deteksi simultan gen *ompW* dan *ctxA* *V. cholerae*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada I Wayan Muda Suta Arta, S.TP. dari Magister Ilmu Biologi, Program Pascasarjana Universitas Udayana yang telah bersedia memberikan kontrol positif *V. cholerae* O1 serotipe Ogawa dan Inaba.

DAFTAR PUSTAKA

- Ali BA, Huang TH, Salem HH, Xie QD. 2006. Influence of Thermal Cycler Day-to-day Reproducibility of Random Amplified Polymorphic DNA Fingerprints. *Biotechnology*. 5: 324–329.
- Alizadeh J, Ranjbar R, Kamali M, Farhadi N, Davari A, Sadeghifard N. 2013. Cloning of *Vibrio cholerae* outer membrane protein W in *Pichia pastoris*. *Iran J Microbiol*. 5(3): 252–528.

- Brooks GF, Carrol KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. 2013. *Medical Microbiology 26th Edition*. McGraw-Hill Companies Inc.
- Chen CH, Shimada T, Elhadi N, Radu S, Nishibuchi M. 2004. Phenotypic and Genotypic Characteristics and Epidemiological Significance of *ctx* Strains of *Vibrio cholerae* Isolated from Seafood in Malaysia. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(4): 1964–1972.
- Dalusi L, Saarenhaemo J, Lyimo TJ, Lugomela C. 2015. Genetic relationship between clinical and environmental *Vibrio cholerae* isolates in Tanzania: A comparison using repetitive extragenic palindromic (REP) and enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) fingerprinting approach. *African Journal of Microbiology Research.* 9(7): 455-462.
- Handoyo D & Ari R. 2000. Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Unitas.* 9(1): 17-29.
- Harini SS, Leelombik M, Kameshwari MNS, Sathyanarayana N. 2008. Optimization of DNA Isolation and PCR-RAPD Methods for Molecular Analysis of *Urginea indica* Kunth. *International Journal of Integrative Biology* 2: 138–144.
- Hill VR, Cohen N, Kahler AM, Jones JL, Bopp CA, Marano N, Tarr CL, Garrett NM, Boncy J, Henry A, Gómez GA, Wellman M, Curtis M, Freeman MM, Turnsek M, Benner Jr, RA, Dahourou G, Espey D, DePaola A, Tappero JW, Handzel T, Tauxe RV. 2011. Toxigenic *Vibrio cholerae* O1 in Water and Seafood, Haiti. *Emerging Infectious Diseases.* 17(11): 2147-2150.
- Lesmana M. 2004. Perkembangan mutakhir infeksi kolera. *J Kedokter Trisakti.* 23(3): 101-109.
- Lin J, Huang S, Zhang Q. 2002. Outer membrane proteins: key players for bacterial adaptation in host niches. *Microbes Infect.* 4: 325–331.
- Maheshwari M, Nelapati K, Kiranmayi B. 2011. *Vibrio cholerae* - A Review. *Veterinary World.* 4(9): 423-428.
- Marlina, Almasdy D, Aufa I. 2007. Deteksi Gen *ctx* pada Bakteri *Vibrio cholerae* Isolat Limbah Cair Rumah Sakit dan Uji Resistensinya Terhadap Beberapa Antibiotik. *J. Sains Tek. Far.* 12(2): 89-95.
- Nandi B, Nandy RK, Nair GB, Shimada T, Mukhopadhyay S, Ghose AC. 2000. Rapid Method for Species-Specific Identification of *Vibrio cholerae* Using Primers Targeted to the Gene of Outer Membrane Protein OmpW. *J. Clin. Microbiol.* 38(11): 4145–4151.
- Padmalatha K & Prasad MNV. 2006. Optimization of DNA Isolation and PCR Protocol for RAPD Analysis of Selected Medicinal and Aromatic Plants of Conservation Concern from Peninsular India. *African Journal Biotechnology* 5: 230–234.
- Ryan KJ & Ray GC. 2004. *Sherris Medical Microbiology: An Introduction to Infectious Disease 4th Edition*. The McGraw-Hill Companies.
- Sathiyamurthy K, Baskaran A, Kumar SD. 2013. Prevalence of *Vibrio cholerae* and Other Vibrios from Environmental and Seafood Sources, Tamil Nadu, India. *British Microbiology Research Journal.* 3(4): 538-549.
- Shirai H, Nishibuchi M, Ramamurthy T, Bhattacharya SK, Pal SC, Takeda Y. 1991. Polymerase chain reaction for detection of the cholera enterotoxin operon of *Vibrio cholerae*. *J Clin Microbiol.* 29(11): 2517–2521.
- Thanananta N & Thanananta T. 2008. Detection of *E. coli* in water using duplex polymerase chain reaction technique. *Thai Journal of Genetics.* 1(2): 109-113.
- Waturangi DE, Wennars M, Suhartono MX, Wijaya YF. 2013. Edible ice in Jakarta, Indonesia, is contaminated with multidrug-resistant *Vibrio cholerae* with virulence potential. *Journal of Medical Microbiology.* 62: 352–359.

- Yasmon A, Yusmaniar, Karuniawati A, Bela B. 2010. Simultaneous detection of *Legionella species* and *Legionella pneumophila* by duplex PCR (dPCR) assay in cooling tower water samples from Jakarta, Indonesia. *Med J Indones.* 19(4): 223-227.
- Yuwono T. 2006. *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction*. Penerbit Andi, Yogyakarta.