

## PREVALENSI GEN *tdh* DAN *trh* *Vibrio parahaemolyticus* PADA UDANG VANAME DI WILAYAH INDRAMAYU, JAWA BARAT

### Prevalence of *tdh* and *trh* Genes of *Vibrio parahaemolyticus* in Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from Indramayu, West Java

Yusma Yennie<sup>1</sup>, Ratih Dewanti Hariyadi<sup>2,3</sup>, dan Achmad Poernomo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, Jl. K.S. Tubun Petamburan VI, Jakarta Pusat, Indonesia

<sup>2</sup> Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor, Indonesia

<sup>3</sup> Southeast Asian Food Agricultural Science and Technology (SEAFST) Center, Institut Pertanian Bogor, Bogor, Indonesia

\* Korespondensi Penulis: yenni.yusma@gmail.com

Diterima: 4 Mei 2015; Disetujui: 10 Juni 2015

#### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui prevalensi *Vibrio parahaemolyticus* patogenik pada udang vaname yang berasal dari tambak tradisional dan intensif berdasarkan keberadaan gen *tdh* dan *trh*. Isolasi dan konfirmasi *Vibrio parahaemolyticus* mengacu pada BAM (2004), yang dilanjutkan dengan konfirmasi gen *tdh* dan *trh* *Vibrio parahaemolyticus* menggunakan metode PCR. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa sebanyak 16/32(50%) dan 6/32 (18,8%) udang dari tambak tradisional dan intensif positif *Vibrio parahaemolyticus*. Berdasarkan gen *tdh*, ditemukan *Vibrio parahaemolyticus* patogenik pada udang tambak tradisional dan intensif berturut-turut adalah 81% (13/16) dan 50% (3/6). Sementara itu, jika didasarkan pada gen *trh*, *Vibrio parahaemolyticus* patogenik pada udang tambak tradisional dan intensif berturut-turut adalah 15/16 (93,8%) dan 4/6 (66,7%). Secara keseluruhan prevalensi udang vaname yang positif gen *tdh* adalah sebesar 72,2% (16/22) gen *trh* sebesar 86,4% (19/22) dan yang memiliki kedua gen adalah sebanyak 63,6% (14/22).

**KATA KUNCI:** *Vibrio parahaemolyticus*, gen *tdh*, gen *trh*, *Litopenaeus vannamei*

#### ABSTRACT

This research aimed to know the prevalence of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from traditional and intensive shrimp ponds based on their possession of *tdh* and *trh* genes. Bacterial isolation and phenotypic characterization was carried out using FDA BAM (2004), and confirmation based on virulent factor gene (*tdh* and *trh* genes) was conducted by Polymerase Chain Reaction (PCR). The result showed that 16/32(50%) and 6/32 (18.8%) shrimp samples from traditional and intensive ponds contained *Vibrio parahaemolyticus*, respectively. Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* due to their possession of *tdh* gene isolated from traditional and intensive ponds were 81%(13/16) and 50% (3/6), respectively. When *trh* gene was used as the basic for classification, pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* obtained from traditional and intensive ponds were reaching up 15/16 (93.8%) and 4/6 (66.7%) respectively. Out of the 22 *Vibrio parahaemolyticus* isolates, 16 (72.7%) were pathogenic based on the possession of gene encoding for *tdh* and 19 (86.4%) can be classified as pathogen based on the *trh* gene. As many as 14 out of 22 (63.6%) *Vibrio parahaemolyticus* isolates owned both *tdh* and *trh* genes.

**KEYWORDS:** *Vibrio parahaemolyticus*, *tdh* and *trh* genes, *Litopenaeus vannamei*

#### PENDAHULUAN

Udang merupakan salah satu komoditas unggulan dalam program revitalisasi Kementerian Kelautan dan Perikanan (KKP). Kontribusi udang terhadap total nilai ekspor perikanan Indonesia pada awal tahun 2014, sebesar 45% dengan total volume ekspor

293.000 ton (Pusat Data, Statistik dan Informasi, 2014). Komoditas udang yang sampai saat ini berkembang pesat dari sisi produksi dan memiliki pasar yang cukup tinggi adalah udang vaname. Udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) banyak dibudidayakan karena lebih tahan penyakit, memiliki waktu pemeliharaan yang lebih singkat (30–120 hari

per siklus), dan juga hemat pakan. Salah satu daerah penghasil udang vaname terbesar di Jawa Barat dengan kontribusi produksi mencapai 73,61% adalah Kabupaten Indramayu. Produksi udang vaname di Indramayu cukup besar karena terdapat 11 kecamatan yaitu Kecamatan Krangkeng, Indramayu, Pasekan, Cantigi, Patrol dan Losarang yang berada di pesisir dan merupakan area budidaya tambak. Budidaya udang vaname di Kabupaten Indramayu mencapai puncaknya pada tahun 2012 melalui program industrialisasi udang vaname yang dicanangkan oleh Kementerian Kelautan dan Perikanan

Namun demikian muncul berbagai permasalahan yang terkait dengan ekspor udang di antaranya adalah kasus penolakan ekspor udang Indonesia. Hal ini berdampak pada kerugian materil yang cukup besar bagi industri pengolahan udang. Salah satu penyebab penolakan ekspor udang adalah akibat kontaminasi mikroba patogen yaitu *Vibrio parahemolyticus*.

*Vibrio parahemolyticus* merupakan flora normal di lingkungan perairan payau dan salah satu spesies *Vibrio* spp. yang bersifat patogen terhadap komoditas udang maupun pada manusia (DePaola *et al.*, 2000). Keberadaan *V. parahemolyticus* patogenik pada produk perikanan dapat menyebabkan penyakit bawaan pangan (*foodborne disease*) pada manusia melalui konsumsi pangan mentah atau pengolahan yang kurang sempurna (Venkitanarayanan & Doyle, 2001; Potasman *et al.*, 2002; Farmer *et al.*, 2003; Eja *et al.*, 2008; Newton *et al.*, 2012; Zarei *et al.*, 2012; Lutz *et al.*, 2013). Hal ini juga dapat disebabkan oleh kontaminasi silang antar pangan olahan dan mentah atau melalui pencucian pangan dengan air yang mengandung *V. parahemolyticus* (Daniels *et al.*, 2000).

Kemampuan *V. parahemolyticus* sebagai penyebab penyakit pada manusia umumnya dihubungkan dengan produksi hemolisin oleh bakteri ini yang dikenal dengan *Thermostable Direct Hemolysin* (TDH) dan *Thermostable Direct Hemolysin-related Hemolysin* (TRH) (Honda & Iida, 1993; Nishibuchi & Kaper, 1995; Makino *et al.*, 2003; Broberger *et al.*, 2011). *Thermostable Direct Hemolysin* (TDH) dikenal sebagai faktor virulensi karena aktivitas  $\beta$  hemolisisnya yang dapat melisis membran sel darah merah sehingga mengakibatkan gastroenteritis. Keberadaan TDH ditandai dengan adanya zona bening pada media agar *Wagatsuma*, di mana *V. parahemolyticus* ditumbuhkan dan hal ini dikenal dengan istilah Fenomena Kanagawa (KP+). Keberadaan KP+ terkait dengan produksi TDH, yang dapat menyebabkan lisis pada membran sel darah merah melalui pembentukan pori sehingga beberapa ion masuk ke dalam sel dan terjadi pembengkakan sel yang mengakibatkan kematian sel karena

ketidakseimbangan ion (Bhunia, 2008). *Thermostable direct hemolysin-related hemolysin* (TRH) disebut sebagai faktor virulensi lain dari *V. parahemolyticus*, di mana keberadaannya dikaitkan dengan hasil Fenomena Kanagawa negatif (KP-) tetapi dapat menyebabkan gastroenteritis. Gen *trh* umumnya dikaitkan dengan *V. parahemolyticus* yang menunjukkan hasil urease yang positif sehingga sering dijadikan indikator untuk identifikasi *V. parahemolyticus* patogenik walaupun tidak mutlak (Suthienkul *et al.*, 1995; Kaufman *et al.*, 2002). Shirai *et al.* (1990) menyatakan bahwa 52 galur dari sampel klinis 8 pasien diare hanya memproduksi TRH sehingga disebut juga sebagai gen patogen *V. parahemolyticus*.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui prevalensi *V. parahemolyticus* patogenik berdasarkan gen penyandi faktor virulensinya (*tdh* dan *trh*) pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) yang berasal dari tambak tradisional dan intensif di Indramayu, Jawa Barat.

## BAHAN DAN METODE

Sampel udang diperoleh dari tambak tradisional yang berlokasi di Kecamatan Cantigi yaitu Desa Cangkring (5 petak tambak), Cantigi Kulon (2 petak tambak), Cantigi Wetan (1 petak tambak) dan Lamaran Tarung (8 petak tambak). Sementara itu untuk tambak intensif, seluruh sampel berasal dari satu areal budidaya tambak sebanyak 16 petak tambak yang berlokasi di Kecamatan Patrol. Jenis udang yang diambil adalah udang vaname siap panen dengan umur pemeliharaan berkisar di atas 2,5 bulan. Periode pengambilan sampel disesuaikan dengan waktu panen tambak yang diperoleh berdasarkan informasi penyuluh Dinas Kelautan dan Perikanan Kabupaten Indramayu yang ditempatkan di kecamatan. Pengambilan sampel dilakukan 2 kali yaitu pada bulan Agustus dan Nopember 2010. Udang yang diambil berkisar 80–90 ekor/kg di tambak tradisional dan 70–80 ekor/kg dari tambak intensif. Udang diambil pada 4 titik di setiap petak tambak dengan total berat sampel per petak tambak berkisar 500 g. Sampel secara aseptis dimasukkan ke dalam plastik steril lalu ditempatkan pada *cool box* yang berisi es curah dan dibawa ke laboratorium untuk dilakukan analisis.

Isolasi dilakukan dengan cara menambahkan 25 g sampel ke dalam 225 ml media pengayaan *Alkaline Saline Peptone Water* (ASPW, Oxoid, England) dan diinkubasikan pada suhu 37 °C selama 24 jam. Homogenat dari media ASPW diinokulasikan ke media agar selektif *Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose* (TCBS, Oxoid, England) dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Koloni tipikal

*V. parahaemolyticus* sebanyak 2–3 koloni diinokulasikan pada media agar miring *Tryptic Soy Agar* (TSA, Oxoid, England) ditambah 2,5% NaCl dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Konfirmasi *V. parahaemolyticus* berdasarkan sifat biokimiawi dilakukan menggunakan *API 20E biochemical test kit* (Biomerieux, France) (Kaysner & DePaola, 2004).

Konfirmasi *V. parahaemolyticus* patogenik yang didasarkan pada gen spesifik *tdh* dan *trh* dilakukan dengan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Pada tahap awal dilakukan isolasi DNA genom dengan metode fenol kloroform. Isolat *V. parahaemolyticus* yang telah diinkubasikan pada media *Tryptic Soy Broth* (TSB, Oxoid, England) ditambah 2,5% NaCl selama 24 jam, disentrifugasi pada kecepatan 13.500 rpm selama 5 menit sehingga terbentuk pelet. *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) 10% ditambahkan pada pelet dan dihomogenisasikan kemudian ditambahkan proteinase-K dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam. RNase 10 µl, *Cetyltrimethyl Ammonium Bromide* (CTAB)/NaCl (10% CTAB dalam 0,7M NaCl), dan NaCl 5M kemudian ditambahkan pada sampel dan diinkubasikan pada suhu 65 °C selama 10–20 menit. Campuran fenol:kloroform:isoamilalkohol (25:24:1) ditambahkan ke dalam sampel dengan rasio 1:1 lalu dihomogenisasikan. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi pada 13.500 rpm selama 10 menit. Fase cair dipindahkan ke *microtube* 1,5 ml, lalu ditambahkan kloroform dan disentrifugasi pada 13.500 rpm selama 10 menit. *Sodium asetat* dan isopropanol ditambahkan dan sampel diinkubasikan pada suhu -20 °C selama 30–60 menit dan disentrifugasi pada 13.500 rpm selama 10 menit. Sampel dicuci dengan etanol 70% dan disentrifugasi. Pelet dikeringkan lalu diresuspendi dalam 100 µl bufer TE dan disimpan di *freezer* -20°C sebelum digunakan (Ausubel et al., 1987; Brown, 1992).

Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan sepasang primer spesifik gen penyandi *tdh* yaitu GGT ACT AA TGG CTG ACA TC dan CCA CTA CCA CTC TCA TAT GC pada pita 251bp dan sepasang primer spesifik gen penyandi *trh* yaitu GGC TCA AAA TGG TTAAGC G dan CAT TTC CGC TCT CAT ATG C pada pita 250bp (Tada et al., 1992). Penentuan primer spesifik untuk mengidentifikasi gen *tdh* dilakukan berdasarkan hasil terbaik dari 6 kombinasi pasangan primer yang menyandikan gen *tdh2*. Gen *tdh2* adalah salah satu dari 2 sub unit identik gen *tdh* yang dimiliki oleh galur *V. parahaemolyticus* patogenik. Pasangan primer gen *tdh* yang paling spesifik berdasarkan hasil penelitian ini, terletak pada daerah antara 256–506 dengan ukuran ampikon 251bp. Sedangkan untuk gen *trh* dipilih 6 kombinasi pasangan primer yang mewakili gen *trh1* dan *trh2*. Hasil penelitian menyebutkan bahwa

pasangan primer spesifik untuk mengidentifikasi toksin TRH adalah primer yang terletak pada daerah antara 256–505 dengan ukuran ampikon 250 bp. Berdasarkan hal tersebut di atas, pasangan primer ini digunakan untuk mengidentifikasi *V. parahaemolyticus* patogenik pada sampel udang tambak.

Reaksi PCR dilakukan menggunakan 25 µl campuran reaktan yang masing-masing mengandung 1 µl primer *forward* dan *reverse* (200nM), 12,5 µl *Go Taq Green Master Mix* yang terdiri dari *Go Taq DNA polymerase*, bufer PCR, 3mM MgCl<sub>2</sub>, dan dNTP, *DNA/RNA free water*, dan cetakan DNA genom. Protokol PCR yang digunakan adalah pre-denaturasi (94 °C, 5 menit), denaturasi (94 °C, 1 menit), penempelan primer (55 °C, 1 menit), ekstensi (72 °C, 1 menit) dan *final extention* (72°C, 7 menit) dengan siklus sebanyak 35 kali. Sebanyak 6–7 µl hasil PCR dielektroforesis pada gel agarosa 2% (w/v), dengan menggunakan bufer TBE1X pada 100 V selama 45 menit. Identifikasi menggunakan kontrol positif yaitu *V. parahaemolyticus* ATCC43996 untuk gen *tdh* dan *V. parahaemolyticus* AQ4037 untuk gen *trh*.

## HASIL DAN BAHASAN

Prevalensi *V. parahaemolyticus* dari total 64 sampel udang yang berasal dari tambak tradisional dan intensif berturut-turut diketahui sebanyak 16/32 (50%) dan 6/32 (18,75%). Hasil ini menunjukkan bahwa prevalensi *V. parahaemolyticus* pada udang tambak tradisional lebih tinggi dibandingkan tambak intensif. *V. parahaemolyticus* merupakan bakteri yang secara alami terdapat di perairan laut, pantai, muara sungai maupun budidaya tambak. Keberadaan *V. parahaemolyticus* pada lingkungan perairan laut yang umumnya diisolasi dari air laut, sedimen, maupun berbagai jenis produk perikanan, telah banyak ditemukan seperti di Indonesia, Jepang, Korea, Thailand, India, dan negara Eropa serta Amerika. *V. parahaemolyticus* merupakan bakteri yang bersifat patogen pada udang dan manusia karena dapat menyebabkan penyakit melalui konsumsi pangan.

Penelitian yang menunjukkan besarnya prevalensi *V. parahaemolyticus* di produk perikanan maupun lingkungan di Indonesia telah dilakukan namun informasinya masih terbatas sekali. Marlina et al. (2007) menyebutkan bahwa 100% sampel kerang (n=47) yang diambil dari perairan dan pasar lokal di Padang-Sumatera Barat diketahui positif *V. parahaemolyticus*. Sementara itu hasil penelitian Dewanti-Hariyadi et al. (2002) menunjukkan bahwa udang yang diambil dari tambak di Jawa Barat dan Jawa Tengah mengandung *V. parahaemolyticus* sebesar 21,8 dan 3,1%, sedangkan sampel udang

beku dari pasar grosir positif *V. parahaemolyticus* sebesar 11,1%, bahkan pada produk udang beku selama proses pembekuan sebesar 70%.

Zulkifli *et al.* (2009) melaporkan persentase *V. parahaemolyticus* pada sampel kerang yang berasal dari perairan di Padang-Sumatera Barat sebesar 50% (n=50). Hal ini kemungkinan karena iklim tropis dengan kisaran suhu 25–35 °C merupakan suhu yang mendukung pertumbuhan *V. parahaemolyticus*. Sebagian besar wilayah dengan iklim tropis khususnya Asia Tenggara diketahui berpotensi terhadap keberadaan *V. parahaemolyticus* dengan persentase sekitar 20–70% (Wong *et al.*, 1999; Ronald & Santos, 2001). Saat pengambilan sampel udang baik di tambak tradisional maupun intensif, suhu air tambak terukur pada kisaran 30–31 °C. Suhu perairan ini diduga menjadi faktor yang dapat membantu pertumbuhan *V. parahaemolyticus* karena merupakan suhu optimum pertumbuhan bakteri tersebut.

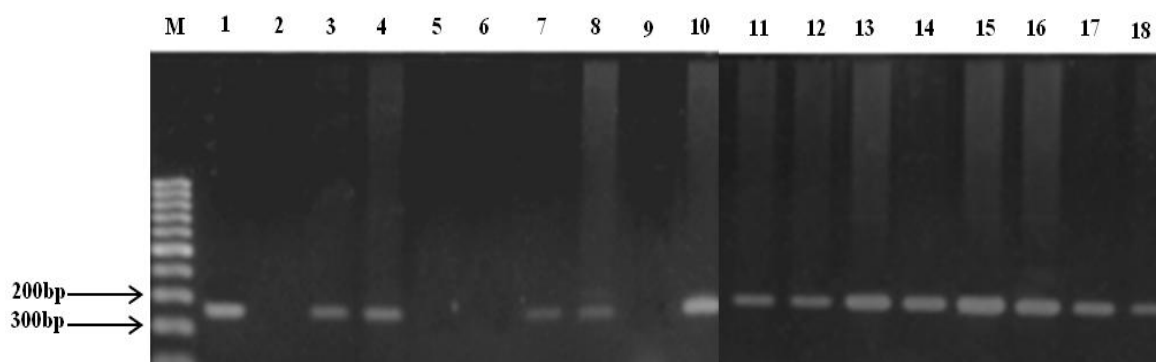
Penelitian keberadaan *V. parahaemolyticus* pada produk perikanan juga telah banyak dilakukan oleh negara-negara di luar Indonesia. Wong *et al.* (1999) menyebutkan bahwa ditemukan 45,9% (n=686) *V. parahaemolyticus* pada produk perikanan (kepiting, lobster, udang, siput, dan ikan) yang diimpor dari Vietnam, Hong Kong, Thailand, dan Indonesia, di mana sebesar 75,8% (n=62) dan 29,3% (n=92) pada sampel udang dan ikan yang berasal dari Indonesia positif *V. parahaemolyticus*. Sementara itu, udang yang berasal dari budidaya tambak di Malaysia menunjukkan 81,7% (n=60) mengandung *V. parahaemolyticus* (Chilek, 2006). Sebanyak 43,6% (n=39) dari sampel *seafood* mentah (cumi-cumi, udang, ikan, dan kekerangan), dan 6,3% (n=16) sampel produk olahan (bakso udang) di Thailand juga diketahui positif *V. parahaemolyticus* (Chitov *et al.*, 2009). Sampel udang, kepiting,

moluska, dan ikan yang diambil dari tempat pendaratan ikan, pasar, dan estuari di India diketahui mengandung *V. parahaemolyticus* sebesar 61,6% (n=86), selain itu sampel udang yang berasal dari tambak di India baik dari wilayah barat maupun timur diketahui positif *V. parahaemolyticus* berturut-turut 12,2 dan 2,8% (n=30) (Dileep *et al.*, 2003; Gopal *et al.*, 2005). Tingginya peluang terjadinya *V. parahaemolyticus* pada produk perikanan menuntut perhatian khusus karena dapat berdampak terhadap kesehatan jika produk perikanan tersebut terkontaminasi *V. parahaemolyticus* patogenik. *V. parahaemolyticus* merupakan salah satu spesies *Vibrio* yang dapat menyebabkan penyakit pada manusia melalui konsumsi pangan terutama pangan mentah atau yang tidak dimasak secara sempurna. Namun demikian tidak semua galur *V. parahaemolyticus* bersifat patogen. Untuk itu perlu dilakukan identifikasi terhadap *V. parahaemolyticus* patogenik pada produk-produk perikanan.

Prevalensi *V. parahaemolyticus* patogenik dengan target gen *tdh* yang diisolasi dari udang tambak tradisional maupun intensif berturut-turut sebesar 81,3% (13/16) dan 50% (3/6) seperti yang tersaji pada Gambar 1 dan 2.

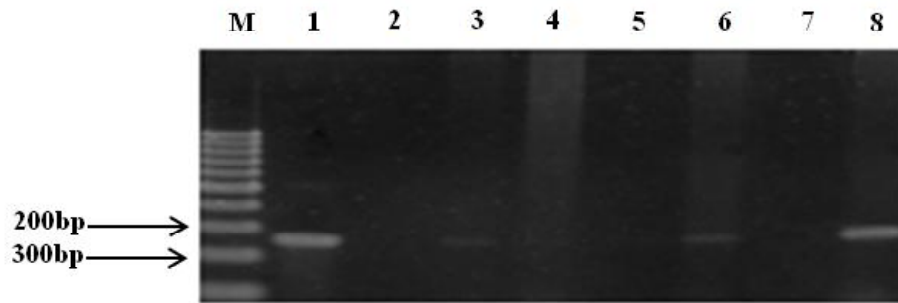
Sementara itu berdasarkan target gen *trh*, hasil amplifikasi DNA dari isolat *V. parahaemolyticus* pada sampel udang di tambak tradisional maupun intensif berturut-turut sebesar 15/16 isolat (93,8%) dan 4/6 isolat (66,7%) positif gen *trh* (Gambar 3 dan 4).

Berdasarkan pengelompokan gen *tdh* dan *trh* isolat *V. parahaemolyticus* dari sampel udang yang berasal dari tambak tradisional dan intensif, beberapa isolat diketahui memiliki kedua gen patogen (*tdh* dan *trh*) yaitu sebesar 63,6% (14/22) isolat. Sedangkan beberapa isolat *V. parahaemolyticus* dari sampel



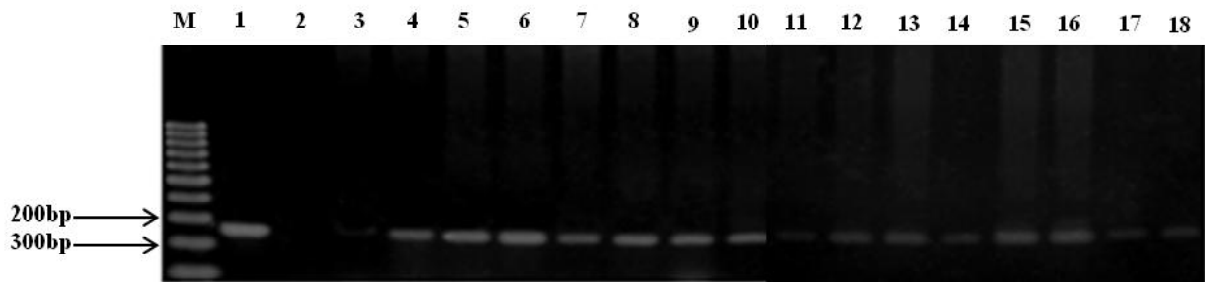
Gambar 1. Visualisasi gen *tdh* *V. parahaemolyticus* dari sampel udang tambak tradisional. M : marker DNA 100 bp, 1 : kontrol positif (ATCC43996), 2 : kontrol negatif, 3–18 : sampel udang dari tambak tradisional.

Figure 1. Visualization of *tdh* gene of *V. parahaemolyticus* from traditional shrimp culture. M : DNA marker 100 bp, 1 : positive control (ATCC43996), 2 : negative control, 3–18 : samples.



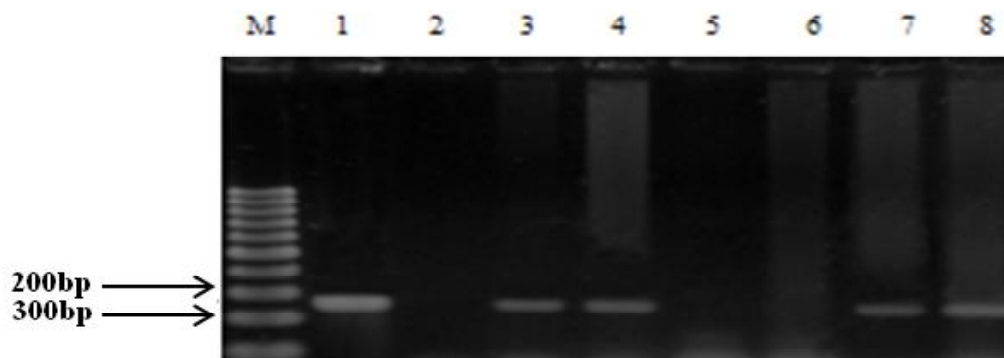
Gambar 2. Visualisasi gen *tdh* *V. parahaemolyticus* dari sampel udang tambak intensif. M : marker DNA 100bp, 1 : kontrol positif (ATCC43996), 2 : kontrol negatif, 3–8 : sampel udang dari tambak intensif.

Figure 2. Visualization of *tdh* gene of *V. parahaemolyticus* from intensive shrimp culture. M : DNA marker 100bp, 1 : positive control (ATCC43996), 2 : negative control, 3–8 : samples.



Gambar 3. Visualisasi gen *trh* *V. parahaemolyticus* dari sampel udang tambak tradisional. M : marker DNA 100 bp, 1 : kontrol positif (AQ4037), 2 : kontrol negatif, 3–18 : sampel udang dari tambak tradisional.

Figure 3. Visualization of *trh* gene of *V. parahaemolyticus* from traditional shrimp culture. M : DNA marker 100 bp, 1 : positive control (AQ4037), 2 : negative control, 3–18 : samples.



Gambar 4. Visualisasi gen *trh* *V. parahaemolyticus* dari sampel udang tambak intensif. M : marker DNA 100 bp, 1 : kontrol positif (AQ4037), 2 : kontrol negatif, 3–8 : sampel udang dari tambak intensif.

Figure 4. Visualization of *trh* gene of *V. parahaemolyticus* from intensive shrimp culture. M : DNA marker 100 bp, 1 : positive control (AQ4037), 2 : negative control, 3–8 : samples.

udang yang berasal dari tambak tradisional maupun intensif hanya memiliki salah satu gen saja (gen *tdh*) atau (gen *trh*) berturut-turut adalah sebesar 2/22 isolat (9,1%) dan 5/22 isolat (22,7%) (Tabel 1).

Berdasarkan data prevalensi yang telah dihasilkan, diketahui bahwa *V. parahaemolyticus* patogenik berpotensi terdapat pada udang tambak yang berasal dari tradisional maupun intensif. Tingginya persentase keberadaan bakteri patogen pada udang tambak yang berasal dari tambak tradisional maupun intensif merupakan cerminan masih rendahnya kesadaran petambak udang dalam menerapkan praktek budidaya yang baik (*Good Aquaculture Practices/ GAP*) terutama pada tambak tradisional. *V.*

*parahaemolyticus* merupakan bakteri alami yang hidup di air payau, sehingga kemungkinan keberadaannya pada tambak udang cukup tinggi karena penggunaan air payau selama pemeliharaan udang.

Berdasarkan pengamatan di lapangan tambak udang tradisional yang dijadikan sebagai tempat pengambilan sampel, jauh dari praktek penerapan GAP. Hal ini dapat dilihat dari tidak tersedianya tempat penampungan air sementara sebelum dialirkan ke areal tambak sehingga air langsung masuk ke tambak tanpa ada perlakuan untuk memenuhi persyaratan kualitas air. Hal ini menyebabkan potensi keberadaan bakteri cukup besar termasuk *V. parahaemolyticus*. Selain itu petambak juga jarang memperhatikan pengelolaan

Tabel 1. Distribusi gen *tdh* dan *trh* pada isolat *V. parahaemolyticus* dari sampel udang di tambak tradisional dan intensif.

Table 1. Distribution of *tdh* and *trh* genes of *V. parahaemolyticus* isolates from traditional and intensive shrimp cultures

Isolat/Isolates	gen <i>tdh</i> / <i>tdh</i> gene	gen <i>trh</i> / <i>trh</i> gene
<b>Tambak tradisional/ Traditional pond :</b>		
TrA1	+	-
TrB2	+	+
TrC2	-	+
TrF2	-	+
TrG1	+	+
TrI1	+	+
TrJ1	-	+
TrK1	+	+
TrK2	+	+
TrL1	+	+
TrM1	+	+
TrN2	+	+
TrO1	+	+
TrO2	+	+
TrP1	+	+
TrP2	+	+
Gen <i>tdh</i> dan <i>trh</i> positif/ <i>tdh</i> and <i>trh</i> genes positive	12/16 (75%)	
Gen <i>tdh</i> positif/ <i>tdh</i> gene positive	1/16 (6,25%)	
Gen <i>trh</i> positif/ <i>trh</i> gene positive	3/16 (18,75%)	
<b>Tambak intensif/ Intensive pond :</b>		
IntB1	+	+
IntB2	-	+
IntC1	-	-
IntC2	+	-
IntG2	-	+
IntO1	+	+
Gen <i>tdh</i> dan <i>trh</i> positif/ <i>tdh</i> and <i>trh</i> genes positive	2/6 (33,3%)	
Gen <i>tdh</i> positif/ <i>tdh</i> gene positive	1/6 (16,7%)	
Gen <i>trh</i> positif/ <i>trh</i> gene positive	2/6 (33,3%)	

Keterangan/Note: (+) : hasil uji positif/*positive result*  
 (-) : hasil uji negatif/*negative result*

kualitas air. Beberapa parameter penting seperti salinitas, pH, oksigen terlarut, dan kekeruhan tidak selalu terukur secara periodik sehingga berdampak terhadap kualitas dan kuantitas udang yang dihasilkan.

Penerapan sistem aerasi pada lahan tambak merupakan hal penting. Pada umumnya luas areal tambak tradisional berkisar 5.000–10.000 m<sup>2</sup> dan idealnya pada tambak tersebut ditempatkan aerator sekitar empat unit. Tambak tradisional memiliki sistem yang statis di mana tidak ada penggantian air tambak sampai waktu panen. Pemberian pakan alami selama periode pemeliharaan udang memberikan peluang kontaminasi bakteri yang cukup besar. Hasil pengamatan dan wawancara dengan petambak tradisional menginformasikan bahwa para petambak membuat sendiri pakan udang dengan cara menghaluskan campuran ikan-ikan rucah yang kemudian dijemur dan dibentuk seperti pelet. Kualitas ikan kondisi sanitasi lingkungan dan higiene personal dalam pembuatan pakan udang menjadi hal penting yang harus diperhatikan untuk menghasilkan kualitas pakan udang yang baik.

Hasil penelitian lain juga memberikan informasi tentang adanya *V. parahaemolyticus* patogenik pada produk perikanan. Bej et al. (1999) melaporkan bahwa sebesar 23,3; 46,7; dan 68,4% *V. parahaemolyticus* yang diisolasi dari produk perikanan, lingkungan tambak, dan tiram merupakan *V. parahaemolyticus* yang memiliki gen *tdh* dan *trh*, sedangkan sebanyak 9,3% dari produk perikanan dan 5,2% dari tambak tiram merupakan *V. parahaemolyticus* penghasil gen *tdh*.

Prevalensi *V. parahaemolyticus* patogenik pada awalnya dilaporkan hanya berkisar 1–5% pada sampel-sampel lingkungan dan produk perikanan (Sakazaki et al., 1968; Miyamoto et al., 1969; Kelly & Stroh, 1988; Kiiyukia et al., 1989; Ogawa et al., 1989; Nishibuchi & Kaper, 1995; Cook et al., 2002; Hervio-Heath et al., 2002; Robert-Pillot et al., 2004). Hal ini diduga karena keberadaan galur *V. parahaemolyticus* patogenik lebih rendah dibandingkan galur yang non patogenik atau galur patogenik lebih sensitif pada kondisi lingkungan yang ekstrim sehingga cepat sekali berubah ke dalam bentuk *viable but nonculturable* (VNC) dan menjadi sulit untuk diisolasi (Jannasch, 1967; Roszak & Colwell, 1987; Hackney & Dicharry, 1988; Pace & Chai, 1989).

Berdasarkan hasil penelitian ini diketahui bahwa *V. parahaemolyticus* patogenik pada sampel udang tambak memiliki persentase yang cukup tinggi. Hasil ini cukup kontras dengan hasil penelitian yang telah dilaporkan sebelumnya. Namun demikian beberapa hasil penelitian lain juga melaporkan bahwa

keberadaan *V. parahaemolyticus* patogenik memiliki persentase cukup tinggi. Marlina et al. (2007) melaporkan bahwa sebesar 36% dari 47 isolat *Vp* pada sampel kerang yang berasal dari perairan dan pasar lokal di Padang-Sumatera Barat teridentifikasi gen *tdh*. Penelitian Sujeewa et al. (2009) melaporkan bahwa 15 dan 7% isolat yang berasal dari sampel lingkungan tambak (sedimen dan air) dan udang beku di Malaysia berturut-turut positif gen *tdh* dan *trh*. Sementara itu Mohammad et al. (2005) menyatakan bahwa sebesar 8 dan 11% sampel udang beku dan udang segar teridentifikasi *V. parahaemolyticus* patogenik. Yingkajorn et al. (2014) menyebutkan bahwa prevalensi *V. parahaemolyticus* patogenik pada udang vaname yang siap panen di Thailand sebesar 14/88 (15,9%) untuk gen *tdh* dan 4/88 (4,6%) untuk gen *trh*. Peningkatan sampel produk perikanan yang mengandung *V. parahaemolyticus* patogenik (gen *tdh*) juga dilaporkan oleh DePaola et al. (2003a) yaitu sebesar 12,8% pada sampel tiram. Selanjutnya Hara-Kudo et al. (2003) melaporkan bahwa sekitar 10% (n=329) isolat dari sampel produk perikanan perairan dan pasar di Jepang mengandung gen *tdh*. Pinto et al. (2008) menyatakan sebesar 33% sampel kekerangan yang berasal dari perairan pantai Italia dideteksi positif gen *tdh*, bahkan hasil penelitian DePaola et al. (2003b) pada sampel makanan dan lingkungan selama kurun waktu 1977–2001 menunjukkan lebih dari 90% isolat positif gen *tdh* dan *trh*.

Identifikasi keberadaan bakteri *V. parahaemolyticus* pada sampel lingkungan dan produk perikanan dipengaruhi oleh beberapa faktor, salah satunya adalah pemilihan metode analisis yang digunakan (Parveen et al., 2008). Selain itu tahap isolasi bakteri yang merupakan tahap awal identifikasi bakteri diduga memberikan persentase yang lebih tinggi terutama yang berasal dari sampel lingkungan dan produk perikanan.

Pada penelitian ini, identifikasi *V. parahaemolyticus* diawali dengan tahap isolasi di mana sampel udang tambak diinkubasi pada media ASPW yang merupakan media pengayaan. Teknik ini merupakan salah satu teknik yang dapat memberikan persentase *V. parahaemolyticus* lebih tinggi karena diduga tahap pengayaan merupakan tahap pemulihan (*recovery*) terutama bakteri-bakteri dalam kondisi sakit.

Raghunath et al. (2009) melaporkan bahwa pada umumnya galur *V. parahaemolyticus* patogenik jarang ditemukan pada sampel lingkungan dan produk perikanan, hal ini disebabkan galur patogen lebih sensitif pada lingkungan perairan yang tidak kondusif sehingga galur ini dapat berubah menjadi *viable but nonculturable* (VNC). Fase ini merupakan fase dorman bakteri di mana pada fase ini bakteri tidak dapat

bermultiplikasi tetapi masih dapat melakukan aktivitas metabolisme. Penyebab terjadinya fase ini umumnya disebabkan karena kondisi lingkungan perairan yang tidak kondusif seperti fluktuasi suhu, salinitas, pH yang cukup tinggi, kandungan nutrisi perairan yang tidak mendukung sehingga memberikan pengaruh terhadap populasi mikroorganisme di perairan tersebut termasuk *V. parahaemolyticus*. Kondisi ini dapat menyebabkan sulitnya mengisolasi *V. parahaemolyticus* patogenik dari lingkungan dan produk perikanan. Untuk mengatasi hal tersebut, tahap pengayaan merupakan salah satu alternatif pengembangan metode analisis yang dapat dilakukan sehingga persentase frekuensi isolasi *V. parahaemolyticus* patogenik dapat meningkat.

Hasil penelitian Raghunath *et al.* (2009) melaporkan bahwa identifikasi *V. parahaemolyticus* patogenik yang dikayakan terlebih dahulu dengan media cair APW (*alkaline peptone water*) dan ST (*sodium taurocholate*) memberikan frekuensi isolasi yang lebih tinggi. Identifikasi *V. parahaemolyticus* patogenik berdasarkan gen penyandi *tdh* dan *trh* pada sampel kekerangan, ikan, udang di perairan pantai dan tambak udang di India memberikan hasil berturut-turut sebesar 32,8 dan 41,4% untuk gen *trh* dan 13,8 dan 20,7% untuk gen *tdh*. Pada awalnya identifikasi *V. parahaemolyticus* patogenik dilakukan berdasarkan reaksi biokimiawi yang dikenal dengan Fenomena Kanagawa (KP+). Metode ini terutama dapat mengidentifikasi faktor virulen TDH yang ditandai dengan KP+, akan tetapi faktor virulen TRH tidak dapat diidentifikasi dengan metode analisis ini, di mana diketahui hasil KP- ternyata memberikan hasil yang dapat menyebabkan penyakit pada manusia. Selain itu beberapa kendala yang dialami teknik konvensional adalah waktu analisis yang panjang, interpretasi hasil yang tidak cukup akurat dan sensitifitas teknik analisis yang masih cukup rendah, terutama pada isolat bakteri yang berada pada fase VNC (*viable but non culturable*). Teknik identifikasi *V. parahaemolyticus* patogenik kemudian berkembang karena masih terbatasnya hasil analisis yang berdasarkan metode biokimiawi. Salah satu pengembangan teknik identifikasi adalah metode PCR. Beberapa hasil penelitian dengan teknik PCR menunjukkan hasil yang cukup signifikan dalam hal identifikasi *V. parahaemolyticus* patogenik. Zimmermann *et al.* (2007) melaporkan hasil deteksi gen *tdh* dan/atau *trh* dengan *real time* PCR pada sampel tiram di perairan Mississippi dan Alabama berturut-turut sebesar 56% dan 44%. Sementara itu Parveen *et al.* (2008) menyatakan bahwa 20% dan 40% isolat dari sampel tiram yang diambil perairan di Amerika Serikat teridentifikasi positif gen *tdh* dan *trh*.

## KESIMPULAN

Prevalensi *V. parahaemolyticus* pada udang tambak tradisional dan intensif berturut-turut adalah 50% (16/32) dan 18,8% (6/32). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa prevalensi *V. parahaemolyticus* pada udang di tambak tradisional lebih tinggi dibandingkan tambak intensif. Hasil konfirmasi secara genetika *V. parahaemolyticus* patogenik pada udang di tambak tradisional dan intensif berdasarkan gen *tdh* berturut-turut adalah 13/16 (81,3%) isolat dan 3/6 (50%) isolat sedangkan *trh* 15/16 (93,8%) isolat dan 4/6 (66,7%) isolat. Sementara itu berdasarkan pengelompokan gen penyandi *tdh* dan *trh*, diketahui sebanyak 14/22 (63,6%) isolat dari udang tambak tradisional maupun intensif memiliki kedua gen tersebut (*tdh* dan *trh*), sedangkan sebanyak 2/22 (9,1%) dan 5/22 (22,7%) isolat diketahui hanya memiliki gen *tdh* atau *trh* saja.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., & Struhl, K. (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York-Wiley.
- Bej, A.K., Patterson, D.P., Brasher, C.W., Vickery, M.C., Jones, D.D., & Kaysner, C.A. (1999). Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh*, and *trh*. *Journal of Microbiology Methods*, 36, 215–225.
- Bhunja, A.K. (2008). Foodborne Microbial pathogens: Mechanism and pathogenesis. *Food Science Text Series*. Springer.
- Broberg, C.A., Calder, T.J., & Orth, K. (2011). *Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants. *Microbes Infect.*, 13, 992–1001. doi: 10.1016/j.micinf.2011.06.013.
- Brown T.A. 1992. Genetics: Molecular Approach, Second Edition. Chapman dan Hall, London.
- Chilek, T.Z.T. (2006). *Prevalence and molecular characteristic of Vibrio parahaemolyticus isolated from cultured tiger prawns (Penaeus monodon) from Malacca*. Thesis. University Putra Malaysia.
- Chitov, T., Wongdao, S., Thatum, W., Puprae, T., & Sisuwan, P. (2009). Occurrence of potentially pathogenic *Vibrio* species in raw, processed, and ready to eat seafood and seafood products. *Maejo Int. J. Sci. Technol.*, 3(01): 88–98.
- Cook, D.W., O'Leary, P., Hunsucker, J.C., Sloan, E.M., Bowers, J.C., Blodgett, R.J., & DePaola, A. (2002). *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in U.S. retail shell oysters: a national survey June 1998 to July 1999. *Journal of Food Protection*, 65, 79–87.
- Daniels, N. A., MacKinnon, L., & Bishop, R. (2000). *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973–1998. *Journal of Infectious Diseases*, 181, 1661–1666.



- DePaola, A., Kaysner, C.A., Bowers, J.C., & Cook, D.W. (2000). Environmental investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters following outbreaks 83 in Washington, Texas, and New York (1997 and 1998). *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 4649–4654.
- DePaola, A., Nordstrom, J.L., Bowers, J.C., Wells, J.G., & Cook, D.W. (2003a). Seasonal Abundance of Total and Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama Oysters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(3), 1521–1526.
- DePaola, A., Ulaszek, J., Kaysner, C.A., Tenge, B.J., Nordstrom, J.L., Wells, J., Puhr, N., & Gendel, S.M. (2003b). Molecular, Serological, and Virulence Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from environmental, food, and clinical sources in North America and Asia. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 3999–4005.
- Dewanti-Hariyadi, R., Suliantari, Nuraida, L., & Fardiaz, S. (2002). Determination of contamination profiles of human bacterial pathogens in shrimp obtained from Java, Indonesia. *Proceedings of a Final Research Coordination Meeting held in Mexico City, Mexico*, 22–26 July 2002. Mexico: IAEA-Tecdoc-1431.
- Dileep, V., Kumar, H.S., Kumar, Y., Nishibuchi, M., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2003). Application of polymerase chain reaction for detection of *Vibrio parahaemolyticus* associated with tropical seafoods and coastal environment. *Letters in Applied Microbiology*, 36, 423–427.
- Eja, M., Abriba, C., Etok, C., Ikpeme, E., Arikpo, G., Enyi-Idoh, K., & Ofor, U. (2008). Seasonal occurrence of Vibrios in water and shellfish obtained from the Great Kwa River Estuary, Calabar, Nigeria. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 81, 245–248.
- Farmer, III, J.J., Janda, J.M., dan Birkhead, K. 2003. *Vibrio*. In Murray, P.R., Baron, E.J., Tenover, J.C., & Tenover, F.C. (eds.). *Manual of Clinical Microbiology* (8th ed., Vol. 1, pp. 706–719). Washington, DC: ASM Press.
- Gopal, S., Ottaa, S.K., Kumar, S., Karunasagar, I., Nishibuchi, M., & Karunasagar, I. (2005). The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety. *Int. J. Food Microbiol.*, 102, 151–159.
- Hackney, C.R. & Dicharry, A. (1988). Seafood-borne bacterial pathogens of marine origin. *Food Technology*, 42, 104–109.
- Hara-Kudo, Y., Sugiyama, K., Nishibuchi, M., Chowdhury, A., Yatsuyanagi, J., Ohtomo, Y., Saito, A., Nagano, H., Nishina, T., Nakagawa, H., Konuma, H., Miyahara, M., & Kumagai, S. (2003). Prevalence of pandemic thermostable direct hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in seafood and the coastal environment in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69 (7), 3883–3891.
- Hervio-Heath, D., Colwell, R. R., Derrien, A., Robert-Pillot, A., Fournier, J.M., & Pommepuy, M. (2002). Occurrence of pathogenic *Vibrios* in coastal areas of France. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 1123–1135.
- Honda, T. & Iida, T. (1993). The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of thermostable direct hemolysin and related hemolysins. *Reviews in Medical Microbiology*, 4, 106–113.
- Jannasch, H.W. (1967). Growth of marine bacteria at limiting concentrations of organic carbon in seawater. *Limnology and Oceanography*, 12, 264–271.
- Kaufman, G.E., Myers, M.L., Pass, C.L., Bej, A.K., & Kaysner, C.A. (2002). Molecular analysis of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from human patients and shellfish during US Pacific north-west outbreaks. *Letters in Applied Microbiology*, 34, 155–161.
- Kelly, M.T. & Stroh, E.M.D. (1989). Urease-positive, Kanagawa-negative *Vibrio parahaemolyticus* from patients and the environment in the Pacific Northwest. *J. Clin. Microbiol.*, 27, 2820–2822.
- Kaysner, C.A. & DePaola, A. (2001). *Vibrio*. In Downes, F.P. and Ito, K. (ed.). *Microbiological Examination of Foods* (pp. 405–428). American Public Health Association, Washington, D.C.
- Kaysner, C.A. & DePaola, A. (2004). *Bacteriological Analytical Manual Chapter 9. Vibrio*. *Bacteriological Analytical Manual*, 8th ed. 2001. U.S. Food and Drug Administration. Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemists.
- Kiiyukia, C., Venkateswaran, K., Navarro, I. M., Nakano, H., Kawakami, H. & Hashimoto, H. (1989). Seasonal distribution of *Vibrio parahaemolyticus* serotypes along the oyster beds in Hiroshima coast. *Journal of Applied and Biology Science*, 28, 49–61.
- Lutz, C., Erken, M., Noorian, P., Sun, S., & McDougald, D. (2013). Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio cholerae*. *Frontiers in Microbiology*, 4, 375–380.
- Makino, K., Oshima, K., Kurokawa, K., Yokoyama, K., Uda, T., & Tagomori, K. (2003). Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *Vibrio cholerae*. *Lancet*, 361, 743–749. doi:10.1016/S0140-6736(03)12659-1.
- Marlina, Radu, S., Kqueen, C.Y., Napis, S., Zakaria, Z., Mutalib, S.A., & Nishibuchi, M. (2007). Detection of *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolated from *Corbicula molitkiana* prime in West Sumatera, Indonesia. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 38(2), 349–355.
- Miyamoto, Y., Kato, T., Obara, Y., Akiyama, S., Takizawa, K., & Yama, S. (1969). In vitro hemolytic characteristic of *Vibrio parahaemolyticus*: Its close correlation with human pathogenicity. *J. Bacteriol.*, 100, 1147–1149.
- Mohammad, A.R., Hashim, J.K., Gunasalam, J., & Radu, S. (2005). *Microbiological risk assessment: Risk Assessment of Vibrio parahaemolyticus in black tiger prawn (Penaeus monodon)*. Technical report, Ministry of Health Malaysia.
- Newton, A., Kendall, M., Vugia, D.J., Henao, O.L., and Mahon, B.E. (2012). Increasing rates of vibriosis in the United States, 1996–2010: review of surveillance data from 2 systems. *Clin. Infect. Dis.*, 54, S391–S395. doi:10.1093/cid/cis243.
- Nishibuchi, M. & Kaper, J.B. (1995). Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: A virulence gene acquired by a marine bacterium. *Infection and Immunity*, 63, 2093–2099.

- Ogawa, H., Tokunou, H., Kishimoto, T., Fukuda, S., Umemura, K. & Takata, M. (1989). Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Hiroshima Bay. *Hiroshima Journal of Veterinary Medicine*, 4, 47–57.
- Pace, J. and Chai, T. 1989. Comparison of *Vibrio parahaemolyticus* grown in estuarine water and rich medium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 1877–1887.
- Parveen, S., Hettiarachchi, K.A., Bowers, J.C., Jones, J.L., Tamplin, M.L., McKay, R. *et al.* (2008). Seasonal distribution of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay oysters and waters. *Int. J. Food Microbiol.*, 128, 354–361.
- Pinto, AD., Ciccarese, G., Corato, RD., Novello, L., & Terio, V. (2008). Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in southern Italian shellfish. *Food Control*, 19, 1037–1041.
- Potasman, I., Paz, A., & Odeh, M. (2002). Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: a worldwide perspective. *Clin Infect Dis.*, 35(8), 921–928.
- Raghunath, P., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. 2009. Improved isolation and detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* from seafood using a new enrichment broth: Short Communication. *Int. J. Food Microbiol.*, 129, 200–203.
- Robert-Pillot, A., Guenole, A., Lesne, J., Delesmont, R., Fournier, J.M., & Quilici, M.L. (2004). Occurrence of the tdh and trh in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from waters and raw shellfish collected in two French coastal areas and from seafood imported into France. *Int. J. Food Microbiol.*, 91, 319–325.
- Ronald, G.L. & Santos, G. (2001). *Guide to foodborne pathogens*. New York: John Wiley and Sons, Inc.
- Rozsak, D.B. & Colwell, R.R. (1987). Survival strategies in the natural environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 51, 365–379.
- Sakazaki, R., Tamura, K., Kato, T., Obara, Y., Yamai, S. & Hobo, K. (1968). Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*. III. Enteropathogenicity, Japan. *J. Med Sci Biol.*, 21, 325–331.
- Shirai, H., Ito, H., Hirayama, T., Nakamoto, Y., Nakabayashi, N., Kumagai, K., Takeda, Y., & Nishibuchi, M. (1990). Molecular epidemiologic evidence for association of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with gastroenteritis. *Infect. Immun.*, 58, 3568–3573.
- Sujeewa, A.K.W., Norrakiah, A.S., & Laina, M. (2009). Prevalence of toxic genes of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimps (*Penaeus monodon*) and culture environment. *Int. Food Research Journal*, 16, 89–95.
- Suthienkul, O., Ishibashi, M., Iida, T., Nettip, N., Supavej, S., Eampokalam, B., Makino, M., & Honda, T. (1995). Urease production correlates with possession of the trh gene in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated in Thailand. *J. Infect. Dis.*, 172, 1405–1408.
- Tada, J., Ohashi, T., Nishimura, N., Shirasaki, Y., Ozaki, H., Fukushima, S., Takano, J., Nishibuchi, M., & Takeda, Y. (1992). Detection of the thermostable direct hemolysin gene (tdh) and the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (trh) of *Vibrio parahaemolyticus* by polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes.*, 6, 477–487.
- Venkitanaranan, K.S. & Doyle, M.P. (2001). Food-borne infections and infestations. In Berdanier, C.D (eds.). *Handbook of Nutrition and Food* (pp. 1135–1161). CRC Press, New York.
- Wong, H.C, Chen, MC., Liu, SH., & Liu, DP. (1999). Incidence of highly genetically diversified *Vibrio parahaemolyticus* in seafood imported from Asian countries. *Int. J. Food Microbiol.*, 52, 181–188.
- Mingkwon, Y., Mitraparp-arhorn, P., Nuanualsuwan, S., Poomwiset, R., Kongchuay, N., Khamhaeng, N. & Vuddhakul, V. (2014). Prevalence and quantification of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* during shrimp culture in Thailand. *Dis Aquat Org.*, 112, 103–111. doi: 10.3354/dao02800.
- Zarei, M., Borujeni, MP., Jamnejad, A., & Khezzzadeh, M. (2012). Seasonal prevalence of *Vibrio* species in retail shrimps with an emphasis on *Vibrio parahaemolyticus*. *Food Control*, 25, 107–109. doi:10.1016/j.foodcont.2011.10.024.
- Zimmerman, A.M., DePaola, A., Bowers, J.C., Krantz, J.A., Nordstrom, J.L., Johnson, C.N., & Grimes, D.J. 2007. Variability of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* densities in northern Gulf of Mexico water and oysters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 7589–7596.
- Zulkifli, Y., Alitheen, N.B., Radu, S., Yeap, S.K., Lesley, M.B., & Raha, A.R. (2009). Identification of *Vibrio parahaemolyticus* isolates by PCR targeted to the ToxR gene and detection of virulence genes. *International Food Research Journal*, 16, 289–296.