

Tersedia online di: <http://ejournal-balitbang.kkp.go.id/index.php/btla>

TEKNIK ISOLASI PRODUK EKSTRASELULER DAN INTRASELULER DARI BAKTERI *Vibrio harveyi*

Sri Suratmi dan Slamet Haryanto

Balai Besar Riset Budidaya Laut dan Penyuluhan Perikanan
Banjar Dinas Gondol, Desa Penyabangan Kecamatan Gerokgak Kabupaten Buleleng, Bali 81101
E-mail: denmasharyoslamet@gmail.com

ABSTRAK

Bakteri pada umumnya memiliki produk ekstraseluler (*extracellular product*/ECP) dan intraseluler sel (*intracellular cell*/ICC). Tujuan dari kegiatan ini untuk mengetahui teknik isolasi ECP dan ICC dari *Vibrio harveyi* yang diisolasi dari ikan kerapu sakit. *V. harveyi* dikultur di atas *membrane cellophane* pada media *tryptic soy agar* (TSA) dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam. ECP diisolasi dari koloni *V. harveyi* (50 mg/mL) dengan proses sentrifugasi, filtrasi, dan dialisis, sedangkan ICC diisolasi dari koloni *V. harveyi* (50 mg/mL) dengan proses sentrifugasi, sonikasi dan filtrasi. Hasil kegiatan menunjukkan bahwa teknik isolasi ECP dan ICC dari *V. harveyi* dengan metode sentrifugasi, filtrasi, dialisis, dan sonikasi dapat menghasilkan produk murni yang tidak mengandung sel *V. harveyi* yang ditunjukkan dengan tidak tumbuhnya koloni setelah dikultur di atas media TSA. Pengamatan hasil elektroforesis menggunakan spektrofotometer menunjukkan nilai absorbansi ECP lebih rendah dibandingkan nilai absorbansi ICC dan sel bakteri utuh.

KATA KUNCI: ECP; ICC; *V. harveyi*; spektrofotometer

PENDAHULUAN

Bakteri merupakan organisme mikroskopik dan memiliki peran besar dalam kehidupan di bumi. Beberapa kelompok bakteri dikenal sebagai agen penyebab infeksi dan penyakit, sedangkan kelompok lainnya dapat memberikan manfaat di bidang pangan, pengobatan, dan industri (Anonim, 2021). Bakteri sangat umum dijumpai di air tawar, payau, dan laut. Sebagian bersifat saprofit namun ada beberapa spesies yang menyebabkan penyakit pada hewan akuatik termasuk ikan. Salah satu bakteri yang sering menyebabkan penyakit pada ikan budidaya air laut adalah bakteri *Vibrio* spp. Jenis bakteri *Vibrio* spp. yang dapat menimbulkan penyakit pada ikan kerapu adalah *Vibrio anguillarum*, *V. ordalii*, *V. fluvialis*, dan *V. alginolyticus* (Desrina *et al.*, 2006). Lebih lanjut dilaporkan bahwa gejala klinis ikan yang sakit yaitu nafsu makan berkurang, berenang miring dan lemah, ginjal pucat, dan warna tubuh gelap. Beberapa isolat *Vibrio* spp. menyebabkan luka di punggung yang berkembang menjadi borok/luka.

Bakteri patogen penyebab penyakit pada ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) di karamba jaring apung (KJA) juga ditemukan dan diidentifikasi sebagai bakteri *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. (carchariae) harveyi*, *V. ordalii*, dan *Micrococcus luteus*. Bakteri patogen tersebut menyebabkan

serangan penyakit dengan rerata waktu kematian mulai 18 jam sampai dengan 69,71 jam dengan mortalitas 38%-100% (Herfiani *et al.*, 2013).

Bakteri *V. harveyi* sering pula menjadi masalah dalam budidaya ikan kerapu di Bali Utara. *V. harveyi* merupakan bakteri Gram negatif, berpendar dalam ruang gelap (mengeluarkan *bioluminescent*), berbentuk batang, motil dengan flagella polar, bersifat fakultatif anaerob, halofilik dan memiliki metabolisme fermentatif dan respiratori. *V. harveyi* tidak dapat tumbuh di bawah 4°C, di mana pertumbuhan optimum pada suhu 30°C sampai 35°C. *V. harveyi* dapat ditemukan berenang bebas pada perairan laut tropis dan dapat menjadi patogen-opportunistik pada ikan laut budidaya (Owens *et al.*, 2006).

Pada kegiatan ini dilakukan uji coba perbanyak bakteri *V. harveyi* pada agar *tryptic soya agar* (TSA) dengan menggunakan *membrane cellophane*. Tujuan dari kegiatan ini adalah untuk mengetahui teknik isolasi *extracellular product* (ECP) dan *intracellular cell* (ICC) dari bakteri *V. harveyi*. Kepadatan komponen ECP dan ICC diukur menggunakan alat spektrofotometer. Spektrofotometer merupakan metode alternatif yang lebih simpel dan lebih akurat jika dibandingkan dengan metode lainnya. Metode ini sederhana karena tidak memerlukan teknik preparasi yang kompleks, dan lebih akurat karena menyertakan

proses kalibrasi dan standardisasi hasil perhitungan sehingga mampu mengurangi efek bias (Zamani & Muhaemin, 2016).

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan meliputi: *Vibrio harveyi* (isolat 34), *triptic soy agar* (TSA), NaCl, *thiosulfate citrate bile salt sucrose agar* (TCBSA), akuades, *phosphate buffer saline* (PBS).

Alat-alat yang digunakan dalam kegiatan ini meliputi: alat tulis; nampan; cawan petri (disposable petridish); *membrane cellophane*; kantong dialisis; *universal closures*; batang *drugalsky*; tabung eppendorf 1,5 mL; mikro pipet; mikro tip 100 µL; tabung plastik steril 15 mL; jarum ose; *drugalsky* (triangle); erlenmeyer; gelas ukur; timbangan analitik; *magnetic stirer*; kertas label; tisu; *aluminium foil*; bunsen; oven; *autoclave*; *laminar airflow*; inkubator; dan kulkas suhu 4°C.

Metode

Persiapan *membrane cellophane*

Lembaran *membrane cellophane* dipotong dan dibentuk bulat sesuai ukuran cawan petri yang digunakan. Potongan *membrane cellophane* dimasukkan dalam cawan petri dan ditutup, serta dibungkus dengan aluminium foil. *Membrane cellophane* dalam cawan petri disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Sterilisasi dapat dilakukan secara bersamaan dengan media TSA dan bahan atau peralatan lainnya. *Membrane cellophane* yang telah steril ditempatkan di tempat yang bersih dan kering.

Pembuatan PBS

PBS dibuat dengan mencampurkan sebanyak 8 g NaCl; 0,2 KCl; 1,44 g Na₂HPO₄; 0,24 g KH₂PO₄ dalam 1.000 mL akuades. Larutan tersebut dihomogenkan di atas *magnetic stirer*. Selanjutnya larutan yang telah homogen di-*ajust* pH-nya hingga 7,4. Larutan disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Larutan PBS yang telah steril didinginkan dalam suhu ruang dan disimpan dalam kulkas 4°C hingga digunakan.

Pembuatan media TSA

Media TSA dibuat dengan melarutkan 4 g serbuk media TSA dan 2 g NaCl dalam 100 mL akuades dalam erlenmeyer steril. Larutan tersebut dipanaskan dan diaduk menggunakan *magnetic stirer* hingga tercampur merata. Larutan yang telah tercampur

merata, selanjutnya disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Larutan yang telah steril didinginkan pada suhu ruang hingga suhu 45°C-50°C dan dituang ke dalam cawan petri di dalam *laminar air flow*.

Pembuatan media TCBSA

Media TCBSA dibuat dengan menimbang 8,8 g serbuk media TCBSA dan melarutkannya dalam 100 mL akuades. Larutan tersebut dipanaskan di atas kompor sambil diaduk secara perlahan hingga media terlarut sempurna. Larutan tersebut didiamkan pada suhu ruang agar suhunya menurun hingga 45°C-50°C. Media selanjutnya dituang ke dalam cawan petri di dalam *laminar air flow*.

Isolat *Vibrio harveyi*

Isolat bakteri yang digunakan merupakan isolat *V. harveyi* (isolat 34) yang merupakan hasil isolasi dan sekuensing yang dilakukan oleh Mahardika *et al.* (2020). Stok isolat bakteri dari agar miring diambil menggunakan jarum ose dan ditumbuhkan di media TCBSA, serta diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Koloni *V. harveyi* pada media TCBSA diambil dengan jarum ose dan ditampung dalam tabung eppendorf. Koloni *V. harveyi* dalam bentuk *pellet* di tabung eppendorf selanjutnya ditimbang dalam timbangan analitik sebanyak 50 mg. *Pellet* tersebut dilarutkan dalam PBS steril (*phosphate-buffered saline*, pH 7,0). sebanyak 1 mL. Semua pekerjaan dilakukan dalam *laminar air flow*.

Isolasi *extracellular product* (ECP)

Isolasi ECP dilakukan mengikuti prosedur Inamura *et al.* (1984), Suprpto *et al.* (1995) dan telah dilakukan beberapa modifikasi oleh Mahardika *et al.* (2020). Isolasi ECP dilakukan dengan mengkultur larutan-*pellet V. harveyi* sebanyak 100 µL pada media TSA yang permukaannya telah dilapisi dengan *membrane cellophane* steril. Larutan-*pellet V. harveyi* disebarkan secara merata di atas *membrane cellophane* dengan batang *drugalsky* dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam.

Sel bakteri dipanen dari *membrane cellophane* dengan 1 mL PBS. Sebanyak 20 cawan petri yang mengandung bakteri dipanen dengan total 10 mL PBS dalam tabung plastik steril 15 mL. Masing-masing 1 mL suspensi sel dimasukkan dalam eppendorf dan disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 15 menit (Gambar 1). Supernatan yang dihasilkan difilter dengan *membrane filter* 0,45 µm. Supernatan yang mengandung ECP dimasukkan dalam kantong dialisis (dialysis sack: MWCO 12,000 Da; Sigma) dan dijepit dengan *universal closures*. Kantong dialisis yang berisi

cairan ECP dimasukkan dalam *beaker glass* yang telah diisi PBS secukupnya agar kantong dialisis terendam dengan baik. *Beaker glass* diinkubasi dalam suhu dingin (4°C). Larutan dalam *beaker glass* diaduk setiap dua jam sekali (Gambar 2), dan larutan PBS diganti setiap empat jam sekali hingga 16 jam (empat kali pergantian). Selanjutnya, ECP *V. harveyi* dimasukkan dalam tabung plastik steril 15 mL dan disimpan pada suhu (4°C) hingga digunakan.



Gambar 1. Sentrifugasi koloni bakteri *V. harveyi*.



Gambar 2. Proses dialisis (pengadukan dari supernatan yang mengandung ECP).

Isolasi *intracellular cell* (ICC)

ICC dikoleksi dari *pellet* bakteri pada 20 kultur *membrane cellophane* dan ditempatkan dalam tabung plastik steril 15 mL. *Pellet* bakteri tersebut ditambahkan 5 mL PBS dan disentrifugasi 4.000 rpm selama 10 menit. Larutan PBS dibuang dan ditambahkan lagi 5 mL PBS baru untuk pembilasan dengan sentrifugasi. Pembilasan dengan PBS dan sentrifugasi dilakukan sebanyak tiga kali. Sel-sel bakteri tersebut selanjutnya ditambahkan 5 mL PBS lagi dan dibagi ke dalam lima eppendorf. Larutan bakteri dalam eppendorf disonikasi selama 20 menit dan disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 15 menit. Supernatan disaring dengan *membrane filter* 0,45 µm. Supernatan yang mengandung ICC *V. harveyi* dimasukkan kembali dalam tabung plastik steril 15 mL dan disimpan pada suhu 4°C hingga digunakan.

Parameter yang diamati

Parameter yang diamati dari hasil isolasi ECP dan ICC meliputi kultur dari kedua produk tersebut pada media TSA untuk mengetahui produk tersebut tidak mengandung sel bakteri hidup, dan pengukuran nilai absorbansi produk dengan alat spektrofotometer.

HASIL DAN BAHASAN

Kemurnian atau ketidakberadaan koloni *V. harveyi* dalam ECP dan ICC dikonfirmasi dengan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri pada media TSA setelah diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam (Tabel 1).

Sel bakteri yang diinaktivasi dengan 0,3% formalin sebagai pembanding juga tidak tumbuh pada media TSA (Tabel 1). Hal tersebut menunjukkan bahwa bakteri *V. harveyi* menjadi inaktif atau mati setelah diberi 0,3% formalin dan diinkubasi selama satu malam pada suhu ruang. Berbeda halnya dengan isolat bakteri *V. harveyi* yang diambil dari stok agar miring masih tumbuh dengan baik hingga 236 koloni dengan pengenceran 10.000 kali (jumlah $2,36 \times 10^7$ cfu/mL). Hasil ini menunjukkan bahwa proses isolasi ECP dan ICC dari *V. harveyi* telah berhasil dilakukan dan dapat digunakan untuk uji coba toksisitas pada ikan laut.

Hasil pengukuran spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm menunjukkan hasil seperti pada Tabel 2.

Nilai absorbansi dari ECP terlihat paling rendah (OD: 0,061) dibandingkan dengan nilai absorbansi ICC (OD: 0,281) dan sel bakteri utuh yang telah diinaktivkan dengan 0,3% formalin (0,073) (Tabel 2). Rendahnya nilai absorbansi dari ketiga bagian bakteri *V. harveyi* kemungkinan dikarenakan oleh sel bakteri yang digunakan untuk proses isolasi ECP dan ICC sebesar 50 mg/mL. Komposisi ruang ekstraseluler meliputi metabolit, ion, berbagai protein, dan zat non-protein yang dapat memengaruhi fungsi seluler (Anonim, 2021a). Komponen ICC lebih tinggi dibandingkan dengan ECP karena ICC merupakan komponen di dalam sel bakteri yang lebih banyak mengandung protein dan zat non protein lainnya.

Isolasi ECP dan ICC dari kegiatan ini sedikit berbeda dengan metode isolasi ECP dan ICC yang sebelumnya dilakukan oleh Hardi *et al.* (2014) di mana proses isolasi ECP bakteri *Pseudomonas* sp. tidak menggunakan proses dialisis. Demikian pula dengan isolasi ICC tidak menggunakan proses sonikasi. Proses dalam penumbuhan bakteri dalam media padat juga tidak menggunakan *membrane cellophane*.

Tabel 1. Hasil kultur ECP dan ICC dari *V. harveyi* pada media TSA

Jenis produk biologi	Pengenceran (x)	Jumlah koloni yang tumbuh pada media TSA
ECP	0	0
ICC	0	0
Sel bakteri utuh (inaktif)	0	0
Isolat <i>V. harveyi</i> (stok agar miring)	10.000	236 koloni

Keterangan: Masing-masing produk dikultur sebanyak 0,1 mL dalam media TSA

Tabel 2. Densitas optik (*optical density*, OD) dari ECP dan ICC *V. harveyi*

Bagian bakteri <i>V. harveyi</i>	<i>Optical density</i> (OD)
ECP	0,061
ICC	0,281
Sel bakteri utuh (inaktif)	2,073

Penggunaan proses dialisis menggunakan kantung membran memungkinkan molekul terlarut yang berukuran lebih kecil dari pori-pori membran tersebut dapat keluar, sedangkan molekul lainnya yang lebih besar akan tertahan di dalam kantung membran. Metode dialisis banyak digunakan dalam pemurnian protein (terutama enzim) (Anonim, 2021b). Proses tersebut dapat menghasilkan produk ekstraseluler yang lebih murni. Demikian pula dengan ICC dengan penambahan metode sonikasi menghasilkan produk yang lebih murni. Metode sonikasi dengan memanfaatkan gelombang ultrasonik di mana generator listrik ultrasonik akan membuat sinyal listrik kemudian diubah menjadi getaran fisik atau gelombang ultrasonik sehingga memiliki efek sangat kuat terhadap sel yang menyebabkan pecahnya sel dan molekul-molekul larutan tersebut (Rusdiana *et al.*, 2018).

Proses isolasi ECP dan ICC dari *V. harveyi* ini mengikuti proses yang dilakukan sebelumnya oleh Suprpto *et al.* (1995) dengan beberapa modifikasi disesuaikan dengan kondisi dan peralatan di Laboratorium Patologi Balai Besar Riset Budidaya Laut dan Penyuluhan Perikanan (BBRBLPP), Gondol, Bali.

Menurut penelitian Dwinanti *et al.* (2014), *S. agalactiae* isolat NK1 yang ditumbuhkan pada media BHI selama 72 jam memiliki konsentrasi protein terlarut pada nilai absorbansi 0,4 adalah 81,75 mg/L. Konsentrasi protein terlarut yang terkandung dalam ECP kasar pada *S. agalactiae* yang ditumbuhkan pada media BHI selama 72 jam pada absorbansi 0,6 adalah 126 mg/L (Suryadi *et al.*, 2017). Isolasi protein toksoid dari hasil fraksinasi gel *acrylamide* SDS-PAGE yang

dilakukan dengan *electro-eluter* menunjukkan tiga pita protein dengan berat molekul 76,52 kDa; 89 kDa; dan 132,92 kDa pada gel elektroforesis dengan pewarnaan *silver staining* (Amrullah *et al.*, 2015).

KESIMPULAN

Dari hasil percobaan dapat disimpulkan bahwa isolasi produk ekstraseluler (*extracellular product*/ECP) dan intraselular sel (*intracellular cell*/ICC) dari bakteri *V. harveyi* dapat dilakukan dengan steril tanpa adanya sel bakteri hidup. Nilai absorbansi ECP lebih rendah dibandingkan nilai absorbansi ICC dan sel bakteri utuh.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih atas bimbingan dan arahan dari peneliti Laboratorium Patologi BBRBLPP. Kegiatan ini merupakan bagian dari riset APBN yang dilakukan oleh Dr. Ketut Mahardika, Indah Mastuti, S.Si., M.Si., dan Ir. Zafran, M.Sc. pada tahun anggaran 2020.

DAFTAR ACUAN

- Amrullah, Sukenda, Harris, E., Alimuddin, & Lusiastuti, A.M. (2015). Toksisitas protein 89 kDa produk ekstraseluler *Streptococcus agalactiae* pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Riset Akuakultur*, 10(3), 397-403.
- Anonim. (2021a). Bakteri. Wikipedia Bahasa Indonesia, ensiklopedia bebas. https://id.wikipedia.org/wiki/Bakteri#Bakteri_Gram_positif_dan_negatif. Halaman ini terakhir diubah pada 10 Februari 2021, pukul 15.30.

- Anonim. (2021b). Dialisis. Wikipedia Bahasa Indonesia, ensiklopedia bebas. <https://id.wikipedia.org/wiki/Dialisis>. Halaman ini terakhir diubah pada 9 Maret 2021, pukul 23.45.
- Desrina, Taslihan, A., Ambariyanto, & Suryaningrum, S. (2006). Uji keganasan bakteri vibrio pada ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*). *Ilmu Kelautan*, 11(3), 119-125.
- Dwinanti, S.H., Sukenda, Yuhana, M., & Lusiastuti, A.M. (2014). Toksisitas dan imunogenisitas produk ekstraseluler *Streptococcus agalactiae* tipe non-hemolitik pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Akuakultur Rawa Indonesia*, 2(1), 105-116.
- Hardi, E.H., Pebrianto, C.A., & Saptiani, G. (2014). Toksisitas produk ekstraseluler dan intraseluler bakteri *Pseudomonas* sp. pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Veteriner*, 15(3), 312-322.
- Herfiani, Rantetondok, A., & Anshary, H. (2013). Diagnosis penyakit bakterial pada ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) pada karamba jaring apung Boneatiro di Kabupaten Buton. <https://www.academia.edu/download/52216257/64a4a8350e78edcc64e14f54f0b87f65.pdf>.
- Inamura, H., Kiyokuni Muroga, K., & Nakai, N. (1984). Toxicity of extracellular products of *Vibrio anguillarum*. *Fish Pathology*, 19(2), 89-96.
- Mahardika, K., Mastuti, I., Nasukha, A., Septory, R., Syahidah, D., Astuti, N.W.W., & Zafran (2020). Pemanfaatan bakteri patogen pada ikan kerapu sebagai kandidat vaksin, serta aplikasi ekstrak herbal untuk penanggulangan infeksi ektoparasit pada budidaya ikan laut. Laporan Teknis Akhir Penelitian, Balai Besar Riset Budidaya Laut dan Penyuluhan Perikanan, Pusat Riset Perikanan Budidaya, Badan Riset dan Sumber Daya Manusia Kelautan dan Perikanan, Kementerian KKP, 29 hlm.
- Owens, L., Busico-Salcedo., & Nancy. (2006). *Vibrio harvey*: Pretty problems in paradise (Chapter 19). In Thompson, Fabiano; Austin, Brian, Swings, Jean. *The Biology of Vibrios*. ASM Press.
- Rusdiana, I.A., Hambali, E., & Rahayuningsih, M. (2018). Pengaruh sonikasi terhadap sifat fisik formula herbisida yang ditambahkan surfaktan dietanolamida. *Agroradix*, 1(2), 34-41.
- Suryadi, I.B.B., Sukenda, & Nuryati, S. (2017). Fraksinasi dan uji toksisitas ECP (*extracellular product*) *Streptococcus agalactiae* isolat NK1 pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Perikanan dan Kelautan*, 8(1), 122-129.
- Zamani, N.P. & Muhaemin, M. (2016). Penggunaan spektrofotometer sebagai pendeteksi kepadatan sel mikroalga laut. *Maspri Journal*, 8(1), 39-48.