

## TEKNIK ISOLASI BAKTERI BERCAHAYA *Vibrio harveyi* PADA LARVA KEPITING BAKAU, *Scylla paramamosain*

Putu Suarjana

Teknisi Litkayasa pada Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut, Gondol

### PENDAHULUAN

Di Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut, Gondol, pembenihan kepiting bakau telah dikembangkan, namun hasilnya belum seperti yang diharapkan. Masalah utama yang dihadapi antara lain adalah tingginya tingkat kematian larva pada stadia zoea. Salah satu penyebab kematian larva tersebut antara lain adanya infeksi patogen, yaitu infeksi bakteri bercahaya *Vibrio harveyi*. Bakteri bercahaya *Vibrio harveyi* diketahui sangat patogen dan dapat menyebabkan kematian massal pada larva kepiting bakau. Bahkan kemungkinan larva sudah terinfeksi dari induknya sejak masa pengeraman telur (Roza, 1997; Roza *et al.*, 1999; Johnny *et al.*, 2001).

Dalam keadaan normal, yaitu kondisi larva kepiting bakau dalam kondisi sehat/fit lingkungan dan bakteri patogen berada dalam keseimbangan, maka bakteri bercahaya *Vibrio harveyi* tidak akan merugikan. Tetapi bila larva berada dalam keadaan *stress*, penyakit bakteri bercahaya akan menjadi patogen yaitu menyerang atau menginfeksi. Sifat dari patogen yang tidak mengganggu inang pada saat tertentu dan akan menekan bila kondisi tertentu, disebut patogen oportunist.

Bakteri bercahaya adalah mikroflora yang umumnya berada pada lingkungan laut estuarin. Dalam kondisi normal tidak menimbulkan masalah bagi organisme akuatik, tetapi kondisi larva yang ada di panti benih (*hatchery*), di mana larva dipelihara secara intensif dengan kepadatan tinggi, biasanya bakteri bercahaya berubah menjadi patogen bagi larva kepiting bakau. Secara bakteriologis, bakteri bercahaya merupakan bakteri gram negatif yang berbentuk batang dengan ukuran lebar 0,5—0,8 milimikron dan panjang 1,4—2,6 milimikron, serta tampak bercahaya (*luminescence*). Daerah sebarannya cukup luas karena bakteri ini mampu hidup pada kondisi apapun. Umumnya bakteri bercahaya banyak terdapat di sekitar perairan pantai, bak-bak tempat pembenihan yang banyak mengandung bahan organik. Bakteri bercahaya

menyerang bersamaan dengan adanya perubahan iklim, suhu, pergantian air, dan pemindahan larva yang dibarengi dengan kondisi fisik larva kepiting bakau yang *stress*. Selain itu padat penebaran yang tinggi dapat memberi peluang larva terserang bakteri bercahaya, karena kontak fisik antar individu bisa mempercepat penularan. Bakteri bercahaya *Vibrio harveyi* yang menginfeksi larva kepiting bakau dapat diisolasi dengan menggunakan media agar penumbuh *Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose Agar* (TCBSA), kemudian setelah dimurnikan pada media *Marine Agar* (MA) dapat diidentifikasi dengan menggunakan metode Bauman *et al.* (1984) dan Holt *et al.* (1994).

### BAHAN DAN TATA CARA

#### Teknik Isolasi

Teknik isolasi bakteri bercahaya *Vibrio harveyi* dari larva kepiting bakau, *Scylla paramamosain* meliputi isolasi bakteri dengan menggunakan media *Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose Agar* (TCBSA) yang merupakan media spesifik untuk bakteri *Vibrio* spp., untuk kemudian diinkubasikan pada suhu 26°C—30°C selama 24—48 jam. Pemurnian terhadap bakteri yang tumbuh dominan dan bercahaya pada media TCBSA dilakukan dengan menggunakan media *Marine Agar* (MA). Hasil pemurnian bakteri ini selanjutnya diidentifikasi berdasarkan acuan dari Bauman *et al.* (1984) dan Holt *et al.* (1994).

#### Alat dan Bahan

##### Penyiapan media penumbuh TCBSA

Bahan yang digunakan adalah TCBSA 8,9 g dan akuades 100 mL. Bahan diaduk rata, dimasukkan ke dalam *autoclave* pada suhu 105°C selama 10 menit kemudian larutan ini dimasukkan ke masing-masing cawan petri di dalam *cleanbench*, didinginkan dan siap digunakan.

### Penyiapan media pemurnian MA

Bahan yang diperlukan adalah MA: 5,51 g; BA (Bacto Agar): 0,30 g; dan akuades 100 mL. Semua bahan diaduk rata, dimasukkan ke dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit kemudian larutan ini dimasukkan ke masing-masing cawan petri di dalam *cleanbench*, didinginkan, dan siap digunakan.

### Metode dan Cara Isolasi Bakteri

#### Isolasi bakteri bercahaya dari larva kepiting bakau

Dari larva kepiting bakau yang terinfeksi dilakukan isolasi bakteri dan kemudian dibiakkan dengan menggunakan media TCBSA yang sudah disediakan, selanjutnya diinkubasikan pada suhu 26°C—30°C selama 24—48 jam. Pemurnian terhadap bakteri yang tumbuh dominan pada media dilakukan dengan menggunakan media *Marine Agar* (MA), dan hasil pemurnian bakteri ini selanjutnya digunakan sebagai bahan uji. Identifikasi isolat bakteri dilakukan berdasarkan acuan dari Bauman *et al.* (1984) dan Holt *et al.* (1994).

#### Identifikasi bakteri bercahaya berdasarkan Bauman *et al.* (1984) dan Holt *et al.* (1994)

Identifikasi dilakukan berdasarkan karakterisasi secara biologi dan biokimia dari isolat bakteri *Vibrio Harveyi* berdasarkan hasil penelitian Bauman *et al.* (1984) dan Holt *et al.* (1994). Ada beberapa uji karakteristik utama bakteri yaitu:

#### Pewarnaan gram

Untuk mendapatkan bentuk bakteri agar kelihatan jelas dan terang maka perlu dilakukan suatu pewarnaan dengan memakai beberapa zat kimia yaitu: larutan B adalah Crystal Violet (biru), K adalah Iodin (kuning), dan M adalah Sapanin (merah). Caranya adalah dibuatkan preparat ulas (*smear*) bakteri pada kaca objek dan dikeringkan, selanjutnya ditetaskan larutan B (Crystal Violet berwarna biru) ke seluruh permukaan kaca dan dibiarkan selama 1 menit, kemudian dicuci dengan akuades dan dikeringkan. Selanjutnya destaining dengan larutan K (Iodin berwarna kuning) dan terakhir larutan M (Sapanin berwarna merah). Setelah preparat kering, dilakukan pengamatan di bawah mikroskop untuk mengamati bentuk dan penyerapan warna hasil pewarnaan. Bakteri digolongkan ke dalam gram (-) apabila warna

yang diserap merah dan dikatakan gram (+) bila warna yang diserap adalah biru/ungu. Untuk bentuk biasanya terlihat: coccus, batang, bacillus, atau spiral.

#### Uji katalase

Pada uji katalase digunakan larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hydrogen Peroksida) 3%. Uji ini bertujuan untuk mengetahui apakah bakteri ini mampu memproduksi gelembung gas O<sub>2</sub> atau tidak. Caranya adalah dengan meneteskan 3—5 tetes larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% pada kaca objek, kemudian diambil bakteri dengan menggunakan jarum ose yang ujungnya berbentuk bulat, diletakkan di atasnya sambil diratakan. Bakteri dengan katalase (+) kelihatan memproduksi gelembung gas sedangkan katalase (-) tidak.

#### Uji oksidase

Uji ini dilakukan untuk melihat apakah bakteri tersebut mampu mengoksidasi perubahan asam dan basa. Pada uji ini digunakan kertas sitochrom yang telah dibasahi dengan 5 tetes akuades yang selanjutnya diambil satu ose isolat bakteri dan diletakkan di atas kertas tersebut sambil diratakan dan akan terjadi perubahan warna pada kertas sitochrom. Bakteri dikatakan bersifat oksidase (+) apabila terjadi pembentukan warna kebiru-biruan atau violet, tetapi kalau tidak ada perubahan berarti bersifat oksidase (-).

#### Uji OF (Oksidatif-Fermentatif)

Uji ini dimaksudkan untuk mengetahui apakah bakteri ini bersifat oksidatif atau bersifat fermentatif. Media yang digunakan adalah media biasa untuk uji O-F yang sudah dimasukkan dan disterilkan dalam tabung reaksi. Untuk 1 isolat bakteri diperlukan 2 tabung reaksi. Caranya: masing-masing tabung diinokulasikan (ditusukkan) bakteri, tabung satu dibiarkan sedangkan tabung kedua ditetesi dengan paraffin cair untuk menutupi O<sub>2</sub> biar tidak masuk. Selanjutnya diinkubasikan pada suhu pada suhu 25°C selama 24 jam. Bakteri oksidatif adalah apabila tabung yang tanpa liquid parafin berubah warna dari hijau menjadi kuning, sedangkan fermentatif apabila pada kedua tabung warnanya menjadi kuning.

#### Uji motility

Uji ini dimaksudkan untuk mengetahui apakah bakteri tersebut memiliki sifat bergerak (*motil*) atau tidak bergerak (*non motil*). Caranya: ditetaskan 1

tetes akuades ke dalam sebuah tutup kaca objek, kemudian diambil sebagian kecil koloni bakteri dan diletakkan pada tetesan akuades serta diaduk rata, selanjutnya diamati di bawah mikroskop. Bakteri motil adalah apabila terlihat adanya gerakan dan sebaliknya non motil bila tidak ada gerakan.

### Pertumbuhan pada NaCl

Uji ini dilakukan untuk melihat toleransi isolat bakteri *Vibrio* spp. terhadap beberapa tingkat NaCl yang berbeda. Caranya: dimasukkan NaCl masing-masing 0%; 0,5%; 3,0%; 6,0%; dan 10,0% ke dalam tabung reaksi yang berisi larutan pepton 1%, kemudian disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Selanjutnya ke dalam masing-masing tabung tersebut diinokulasikan bakteri *Vibrio harveyi* menggunakan jarum ose lalu diaduk sampai bakteri hancur sempurna dengan menggunakan *automatic mixer*. Semua tabung diinkubasikan kembali pada suhu 25°C selama 24 jam. Bakteri disebut toleransi terhadap NaCl apabila di dalam tabung tidak terlihat adanya pertumbuhan, tidak toleransi terhadap NaCl apabila di dasar tabung tumbuh bakteri berwarna putih seperti kapas.

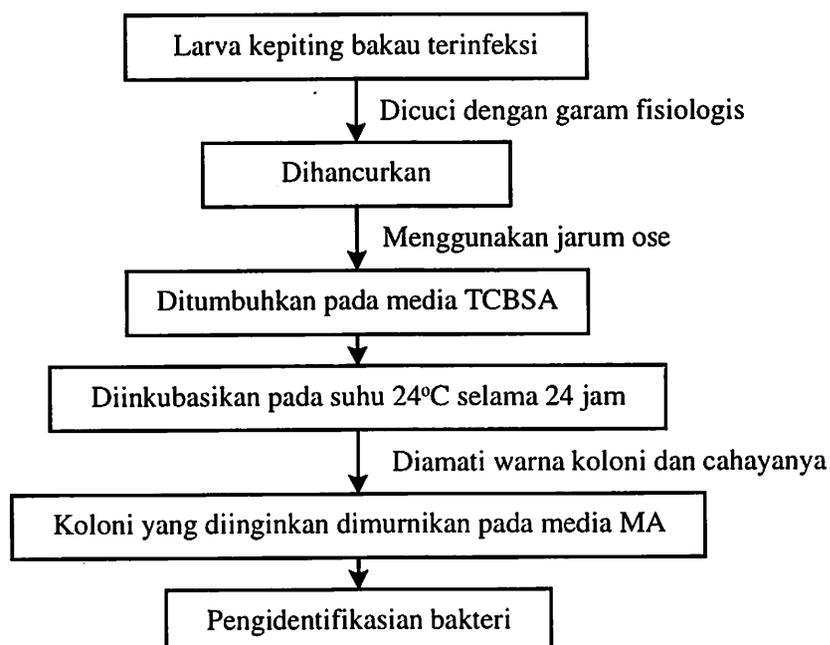
### Uji L Arginin, L Lysin, dan L Ornithin

Uji ini dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri tersebut mampu mengoksidasi unsur-unsur asam

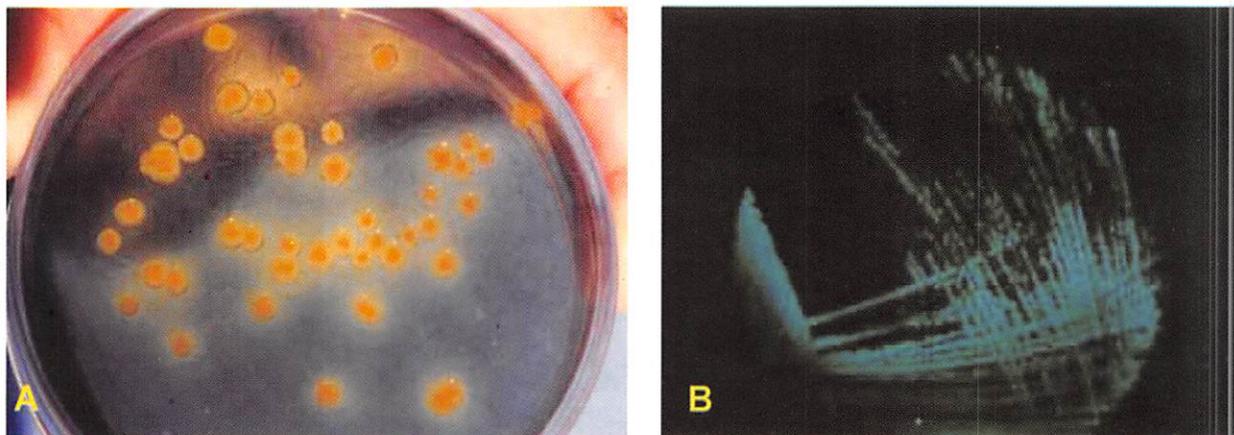
amino sebagai penyusun protein atau tidak. Media dasar dalam uji ini adalah Decarboxilase base moeler, L-arginin, L-lysine, dan L-ornithin dengan konsentrasi akhir masing-masing 1%. Caranya masukkan masing-masing 5 mL media ke dalam tabung reaksi, atur pH-nya sehingga mencapai pH 6 dan disterilkan pada suhu 121°C selama 10 menit. Selanjutnya diinokulasikan isolat bakteri menggunakan jarum ose, diinkubasikan pada suhu 25°C selama 24 jam dan diamati perubahan warna selama 7 hari. Apabila terjadi perubahan warna dari hijau menjadi kuning berarti bakteri tersebut dapat mensintesis L-arginin, L-lysine, atau L-ornithin sebagai sumber nitrogen dan energi.

### POKOK BAHASAN

Dari isolasi yang dikerjakan dengan metode berdasarkan Bauman *et al.* (1984) dan Holt *et al.* (1994) yang terilustrasi (Gambar 1), ternyata bakteri ini termasuk ke dalam spesies *Vibrio harveyi*, ini dapat dilihat dari beberapa kesamaan karakter antara lain; gram negatif, katalase, dan oksidase positif, fermentatif pada uji OF, motilitas positif, positif pada reaksi indol, reaksi L. Arginin positif dan reaksi Gelatin positif. Demikian juga reaksi pada asam dari selobiose, glucose dan manose positif. Pada media Agar penumbuh terlihat bercahaya dan koloni berwarna hijau yang tumbuh pada suhu 35°C (Gambar 2). Sedangkan pada toleransi NaCl 0,5%—6% reaksi



Gambar 1. Proses isolasi bakteri bercahaya dan pengidentifikasiannya berdasarkan metode Bauman *et al.* (1984) dan Holt *et al.* (1994)



Gambar 2. Bentuk koloni bakteri bercahaya *Vibrio harveyi* pada media penumbuh TCBSA (A) dan tampak bercahaya dalam kondisi gelap (B)

positif. Isolat ini juga sensitif terhadap Agen Vibriostatik dan Novobiosin, maka didapatkan karakteristik dari jenis bakteri yang menginfeksi larva kepiting bakau seperti pada Tabel 1.

Dari karakteristik tersebut di atas jelas bahwa yang menginfeksi larva kepiting bakau yang sakit adalah bakteri *Vibrio harveyi* yang diketahui sangat patogen dan dapat menyebabkan kematian massal (Roza, 1997).

### KESIMPULAN

Teknik isolasi bakteri bercahaya *Vibrio harveyi* dari larva kepiting bakau, *Scylla paramamosain* meliputi penyiapan media penumbuh spesifik *Vibrio* yaitu *Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose Agar* (TCBSA), media pemurni *Marine Agar* (MA), dan media identifikasi pada pengerjaannya cukup akurat, mudah, dan relatif murah.

### DAFTAR PUSTAKA

- Baumann, P., A.L. Furnis, and J.V. Lee. 1984. Facultatively anerobic gram-negative rods. In Krieg, N.R. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, USA.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, and S.T. Williams. 1994. Facultatively anaerobic gram-negative rods. In P.H.A. Sneath, J.T. Staley, D.J. Brenner, J.G. Holt, R.W. Castenholz, K. Schleifer, J.G. Tully, J. Ursing, S.T. Williams (Eds.). *Bergeys Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth Edition. Williams & Wilkins, Baltimore, Philadelphia, Hong Kong, London, Munich, Sydney, Tokyo, p. 259—289.
- Johnny, F., D. Roza, dan Yunus. 2001. Pengendalian penyakit pada larva kepiting bakau melalui penggunaan immunostimulan. *J. Pen. Per. Indonesia*, 7(3): 62—65.
- Roza, D. 1997. Tingkat keganasan dan penanggulangan bakteri *Vibrio* bercahaya pada larva kepiting bakau (*Scylla serrata*). *Prosiding II Seminar Nasional Biologi XV, Perhimpunan Biologi Indonesia, Bandar Lampung*, p. 501—504.
- Roza, D, F. Johnny, dan Yunus. 1999. Pengendalian *Vibrio harveyi* pada larva kepiting bakau, *Scylla serrata* Forskal melalui desinfeksi induk selama pengeraman telur. *J. Pen. Per. Indonesia*, 5(2): 28—34.

Tabel 1. Karakteristik beberapa jenis bakteri *Vibrio harveyi* menurut Bauman *et al.* (1984) dan Holt *et al.* (1994)

Karakteristik	Bauman <i>et al.</i> (1984)	Holt <i>et al.</i> (1994)
Pewarnaan gram	-	-
Katalase	+	+
Oksidase	+	+
Uji O-F	F	F
Motilitas	+	+
H <sub>2</sub> S	-	-
Indol	+	+
Gas dari glukose	-	-
L-Arginin	+	+
L-Ornithin	-	-
Gelatin	+	+
Asam dari :		
- Selobiose	+	+
- Glukose	+	+
- Manose	+	+
- Sorbitol	-	-
- Sukrose	-	-
Bercahaya	+	+
Tumbuh pada suhu :		
- 35(°C)	+	+
- 42(°C)	-	-
Toleransi terhadap NaCL :		
- 0,0%	-	-
- 0,5%	+	+
- 3,0%	+	+
- 6,0%	+	+
- 10,0%	-	-
Sensitif terhadap :		
- Agen vibriostatik	S	S
- Novobiosin	S	S
Warna koloni pada TCBSA	H	H

Keterangan:

+ = positif, - = negatif, F = fermentatif, S = sensitif, H = hijau