

### **III. METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Tempat**

Penelitian mengenai identifikasi bakteri patogen pada ikan badut dilaksanakan pada bulan Maret – Mei 2013. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Budidaya Perikanan Program Studi Budidaya Perairan Fakultas Pertanian Universitas Lampung dan Laboratorium Penguji Stasiun Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Kelas I Lampung.

#### **3.2 Alat dan Bahan Penelitian**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian antara lain petri disk, jarum ose, tabung reaksi, pinset, gunting, spektrofotometer, pembakar bunsen, mikropipet, mikroskop, gelas objek, gelas penutup, labu Erlenmeyer, kaca pembesar, pipet tetes, timbangan analitik, kompor gas, spuit, ember, batu aerasi, selang aerasi, autoklaf, *hot plate*.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain sampel ikan badut yang sakit berukuran 3-5 cm (umur 4-6 bulan), media TSA (*Trypticase Soy Agar*), NaCl 2,5% (*Natrium Chlorida*), media TSB (*Tryptic Soy Broth*), media TCBS (*Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose*), media GSP (*Glutamate Starch Phenol*), aquades, spiritus, dan bahan-bahan kimia untuk analisa morfologi dan uji biokimia.

### 3.3 Prosedur Penelitian

#### 3.3.1 Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan secara non random, yaitu dengan mengambil ikan badut yang memiliki gejala penyakit baik dalam keadaan hidup, hampir mati atau mati (Nitimulyo dan Triyanto, 1989). Sampel yang digunakan adalah ikan badut dengan panjang 3-5 cm yang berumur 4-6 bulan yang berasal dari Balai Besar Pengembangan Budidaya Laut (BBPBL) Lampung. Beberapa gejala awal yang dapat membantu pengambilan sampel adalah pembuluh darah tampak jelas terutama pada sirip, perubahan warna bintik-bintik merah atau hemoragik, tampak lemah, selalu di permukaan atau di dasar, anoreksia, bernafas cepat, berenang tidak beraturan, posisi tubuh miring, tegak atau terbalik, atau buta.

#### 3.3.2 Pengamatan Gejala Penyakit

##### 3.3.2.1 Pengamatan gejala eksternal (*external examination*)

Pengamatan dilakukan terhadap gejala yang timbul pada bagian luar tubuh. Tanda-tanda atau gejala penyakit yang terlihat dari luar sangat bervariasi, bergantung jenis atau intensitas serangan penyakit. Gejala yang dapat diamati pada ikan yang terserang bakteri patogen diantaranya pembuluh darah tampak jelas terutama pada sirip, perubahan warna bintik-bintik merah atau haemoragik, kelihatan lemah, selalu di permukaan atau di dasar, tidak mau makan, bernafas cepat, berenang tidak beraturan, posisi tubuh miring, tegak atau terbalik, atau buta.

### 3.3.2.2 Pengamatan gejala internal (*internal examination*)

Pemeriksaan gejala dalam dilakukan dengan cara membedah (*sectio*) ikan badut dan mengamati gejala yang timbul pada organ dalam seperti: insang, alat pencernaan, hati, dan ginjal.

### 3.3.3 Isolasi dan Pemurnian Bakteri

Isolasi bakteri dari sampel ikan badut dilakukan dari luka ataupun secara aseptik dari organ insang, ginjal, hati, dan alat pencernaan menggunakan ose steril pada media TSA dengan penambahan NaCl 2,5%, media GSP 2,5% NaCl dan media TCBS. Inkubasi dilakukan pada suhu kamar selama 18-24 jam.

Pemurnian bakteri dilakukan dengan memisahkan bakteri yang mempunyai morfologi koloni berbeda. Pengamatan morfologi koloni meliputi bentuk koloni, elevasi, bentuk, tepi dan warna koloni. Pengamatan koloni bakteri meliputi bentuk sel bakteri dan pengecatan Gram. Isolat bakteri murni kemudian disimpan dalam agar miring yang diberi parafin cair steril.

### 3.3.4 Pengujian Postulat Koch

Postulat Koch berisi empat kriteria yang diperlukan untuk membuktikan bahwa mikroba spesifik merupakan penyebab penyakit tertentu. Koloni bakteri murni yang diduga sebagai penyebab penyakit dikultur dalam media cair TSB dengan penambahan NaCl 2,5%, kemudian diinkubasi selama 24 jam. Kultur bakteri tersebut digunakan untuk reinfeksi ikan badut. Reinfeksi dilakukan dengan cara menginfeksi kembali ikan badut dengan bakteri secara suntikan pada punggung (*intra muscular*) dengan konsentrasi bakteri  $10^9$  CFU/ml per ekor dan tiap isolat disuntikkan pada 3 ekor ikan badut. Uji Postulat Koch

menggunakan konsentrasi  $10^9$  CFU/ml per ekor bertujuan untuk meningkatkan virulensi bakteri sehingga menunjukkan bakteri tersebut dapat menyebabkan penyakit atau tidak. Ikan badut merupakan ikan yang sensitif sehingga ikan badut perlu dibius terlebih dahulu sebelum dilakukan penyuntikan agar ikan badut tidak stres dan mati. Pembiusan dilakukan secara perendaman dengan menggunakan minyak cengkeh dengan dosis 0,1 ml minyak cengkeh dalam 1L air laut. Ikan badut yang telah direinfeksi dipelihara selama 7 hari dan diamati gejala penyakitnya setiap hari. Isolat bakteri yang menimbulkan gejala penyakit seperti pada pengambilan sampel awal merupakan bakteri patogen pada ikan badut. Ikan yang mengalami kematian dihitung rata-rata waktu kematiannya. Rerata waktu kematian (*Mean Time to Death*, RWK) ikan pada uji Postulat Koch diperhitungkan (Hubert, 1980) sebagai berikut:

$$MTD = \frac{\sum_{i=1}^n a_i b_i}{\sum_{i=1}^n b_i}$$

Keterangan:

MTD : *Mean Time to Death* (rerata waktu kematian)

$a_i$  : waktu kematian pada jam ke- $i$  (jam)

$b_i$  : jumlah ikan uji yang mati pada jam ke- $i$  (ekor)

### 3.3.5 Reisolasi

Reisolasi dilakukan untuk mengetahui bakteri hasil reinfeksi apakah sama dengan bakteri yang disuntikkan pada saat direinfeksi. Reisolasi dilakukan setelah ada ikan badut yang mati atau memiliki gejala penyakit yang parah dari hasil reinfeksi.

### 3.3.6 Identifikasi bakteri

Identifikasi bakteri patogen penyebab penyakit pada ikan badut yang meliputi morfologi koloni, morfologi sel bakteri dan pengujian biokimia. Pengamatan morfologi koloni dan pengecatan Gram dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri tersebut sama dengan bakteri yang menyebabkan penyakit.

#### 3.3.6.1 Pengamatan morfologi koloni

Pengamatan morfologi koloni dilakukan pada isolat bakteri yang telah murni dan terpisah. Bakteri lalu diinokulasi pada media TCBS dan GSP kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 24-48 jam. Pengamatan ini meliputi bentuk, tepi, elevasi, warna dan ukuran (Anonim, 1994).

#### 3.3.6.2 Pengamatan morfologi sel bakteri

Pengamatan morfologi koloni dilakukan dengan pengecatan Gram. Pengecatan Gram dilakukan untuk mengetahui jenis Gram, dan bentuk sel bakteri. Pengecatan bakteri dimulai dengan membuat sediaan tipis satu ose bakteri ditambah akuades secukupnya pada gelas objek yang difiksasi di atas nyala api sampai kering dan agar tidak terlepas saat dibilas dengan air. Sediaan tersebut lalu digenangi dengan larutan Kristal violet (Gram A) selama 1-2 menit setelah itu larutan Kristal violet dibuang dan dibilas dengan air mengalir. Kemudian, sediaan digenangi dengan larutan iodin (Gram B) selama 1 menit kemudian cat Gram B dibuang dan dibilas dengan air mengalir. Selanjutnya, sediaan digenangi dengan larutan pemucat (Gram C) selama 30 detik dan mencucinya dengan air mengalir. Larutan safranin (Gram D) diberikan

selama 1 menit kemudian dicuci dengan air mengalir dan kering anginkan. Sediaan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran kuat menggunakan minyak imersi. Bakteri Gram negatif berwarna merah dan bakteri Gram positif berwarna ungu (Anonim, 1994).

### 3.3.6.3 Pengujian Biokimia

#### 1. Uji katalase

Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui bakteri yang dapat menghasilkan enzim katalase. Pengujian dilakukan dengan meneteskan  $H_2O_2$  3% pada gelas objek, kemudian satu ose koloni bakteri digoreskan pada larutan tersebut. Katalase positif (+) ditunjukkan dengan timbulnya gelembung udara sedangkan katalase negatif (-) tidak timbul gelembung udara (Anonim, 1994).

#### 2. Uji Oksidatif-Fermentatif

Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menguraikan glukosa. Pengujian dilakukan dengan menggunakan medium O/F (medium Hugh dan Leifson) yang mengandung 1 % glukosa pada tabung reaksi. Bakteri diinokulasi pada dua medium tegak, yang salah satu tabung ditutup paraffin cair steril setinggi 1 cm dari permukaan medium, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 24-48 jam. Medium pada tabung tanpa paraffin cair steril berubah warna dari biru menjadi kuning dan tabung lainnya tetap biru berarti bakteri bersifat oksidatif. Medium pada kedua tabung berubah warna dari biru menjadi kuning berarti bakteri bersifat fermentatif. Medium di kedua tabung tidak berubah berarti bakteri tidak memecah glukosa dalam medium (Anonim, 1994).

### 3. Uji Motilitas, Indol dan Ornithin (MIO)

Pengujian tiga sifat kimia ini menggunakan medium motility, indol dan ornithin (MIO). Bakteri yang tumbuh menyebar dari garis tusukan menunjukkan sifat motil, sedangkan bila tumbuhnya hanya mengikuti garis tusukan menunjukkan sifat non motil (Anonim, 1994).

Pengujian indol dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menghasilkan indol dari tryptophan. Pengujian dilakukan dengan menambah 5 tetes reagen Ehrlich dalam medium. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya lapisan tipis (cincin) berwarna merah muda antara medium dengan reagen Ehrlich. Pembentukan ornithin memiliki tanda yaitu terjadinya perubahan sebagian warna medium menjadi kuning.

### 4. Uji Oksidase

Pengujian oksidase dilakukan untuk mengetahui adanya enzim oksidase pada bakteri. Satu ose koloni bakteri digoreskan pada kertas oksidase. Pengamatan dilakukan dengan melihat reaksi yang ditimbulkan, apabila hasil goresan berwarna biru pada kertas oksidase menunjukkan bahwa bakteri yang diuji mempunyai enzim oksidase positif dan jika tidak terjadi perubahan warna menunjukkan hasil oksidase negatif (Anonim, 1994).

### 5. Uji Sitrat

Uji sitrat dilakukan untuk mendeterminasi kemampuan bakteri menggunakan asam sitrat sebagai sumber karbon untuk metabolisme. Uji sitrat dilakukan dengan menggunakan media *Simone Citrate Agar*. Bakteri dari biakan murni diinokulasikan pada media *Simone Citrate Agar* dan diinkubasi selama

24-48 jam pada suhu kamar. Pengamatan dilakukan dengan melihat perubahan warna yang terjadi pada medium. Hasil uji positif jika bakteri tumbuh dengan merubah warna media dari hijau menjadi biru dan hasil negatif jika bakteri yang diinokulasikan tidak tumbuh serta tidak terjadi perubahan warna.

#### 6. Uji *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA)

TSIA pada prinsipnya digunakan untuk mendeterminasi bakteri yang mampu menggunakan gabungan beberapa karbohidrat khusus. Satu ose bakteri dari biakan murni diisolasikan ke dalam media TSIA agar miring dengan metode goresan dan secara tusukan dan kemudian diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu ruang. Pengamatan dilakukan dengan melihat perubahan warna yang terjadi pada goresan maupun tusukan. Warna merah menunjukkan reaksi alkali yang ditulis dengan simbol (K), jika berubah warna menjadi kuning menunjukkan reaksi asam yang diberi simbol (A) dan apabila tidak terjadi perubahan warna maka ditulis dengan simbol NR yang berarti tidak terjadi reaksi (Anonim, 1994).

#### 7. Uji *Lysin Iron Agar* (LIA)

Uji LIA dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam memproduksi Lysine Dikarboxylase dapat diketahui dan juga produksi H<sub>2</sub>S. Lysin Iron Agar adalah agar semi solid yang mengandung dekstrose dan L-lysine sebagai unsur utama serta brom cresol purple sebagai indikator. Jika bakteri hanya memfermentasi dekstros maka dasarnya akan berwarna kuning, tetapi bakteri yang memfermentasi dekstros serta mendekarboksilase L-lysine, maka pH kembali menjadi alkali sehingga akan terlihat medium secara



keseluruhan berwarna ungu dengan adanya indikator brom crose purple. Uji LIA dilakukan dengan mengambil satu ose biakan bakteril, kemudian dimasukan ke dalam dasar tabung agar dan dioleskan ke seluruh permukaanya kemudia diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Terjadinya warna ungu pada seluruh bagian berarti tes positif. Jika tidak ada perubahan warna atau dasarnya berwarna kuning maka tes dinyatakan negatif (Buller, 2004).

### **3.4 Analisis Data**

Data hasil penelitian akan dianalisis secara deskriptif dan data disajikan dalam bentuk gambar dan tabel. Pengumpulan data dilakukan untuk mengetahui jenis-jenis bakteri patogen yang dapat menyerang ikan badut khususnya di balai benih tempat dilakukan pengambilan sampel.