

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei sampai Oktober 2014, di Laboratorium dan Fasilitas Karantina *Marine Research Center* (MRC) PT. Central Pertiwi Bahari (CPB), *Hatchery* Suak, Sidomulyo, Lampung Selatan.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Penapisan bakteri kandidat probiotik penghambat *V. harveyi* secara *in vitro*

- Alat : cawan petri, spreader, jarum ose, bunsen, mikro pipet, tip, paper disk, *eppendorf*, autoklaf, oven, inkubator, *laminar air flow*, tabung reaksi, *beaker glass*, *vortex*, *hot plate stirer*, timbangan digital, aluminium foil, masker, sarung tangan.
- Bahan : suplemen udang media Luria Bertani Agar (Lampiran 1), media *Tryptone Soy Broth* (Oxoid), alkohol 70% dan 96%, Isolat bakteri *Vibrio harveyi*, KOH 3%, H₂O₂ 3%, *Triple Sugar Iron Agar* (Oxoid), *Simmon's citrate* BBL™, larutan garam fisiologis 0,85%.

3.2.2 Uji patogenisitas bakteri kandidat probiotik penghambat *V. harveyi* terhadap larva udang vannamei

- Alat : toples plastik 3 liter, selang aerasi, batu aerasi, bak fiber, baskom, pipet plastik, mikro pipet, wadah kultur artemia 1,5 liter, gelas ukur 100 mL, saringan, ember.
- Bahan : larva udang vannamei, isolat bakteri, *Artemia* sp., pakan CP 01, algae (*Chaetoceros* sp.), air laut yang sudah di treatment.

3.2.3 Uji kemampuan penghambatan *V. harveyi* secara *in vivo* (uji tantang)

- Alat : toples plastik 3 liter, selang aerasi, batu aerasi, bak fiber, baskom, pipet plastik, mikro pipet, wadah kultur artemia 1,5 liter, gelas ukur 100 mL, saringan, ember.
- Bahan : larva udang vannamei, isolat bakteri, *Artemia* sp., pakan CP 01, algae (*Chaetoceros* sp.), air laut yang sudah di treatment, media *Thiosulfate Citrate Bile Sucrose* (TCBS) (Oxoid).

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Isolasi dan Pemurnian Bakteri Kandidat Probiotik Penghambat Pertumbuhan *V. harveyi* dari Suplemen Udang

Penelitian ini menggunakan media Luria Bertani Agar (LBA) (Lampiran 1). Sampel suplemen diisolasi pada media dengan menggunakan pengenceran 10^0 , 10^{-1} , dan 10^{-2} , sebanyak 100 μ l disebar pada media menggunakan spreader dan diinkubasi selama 24 jam. Setelah diinkubasi kemudian diamati koloni yang tumbuh, koloni

bakteri diamati untuk melihat morfologi awal pada media tersebut, lalu disamakan bentuk, warna, dan tepi koloni bakteri. Kemudian koloni bakteri dimurnikan untuk mengetahui apakah bakteri tersebut memiliki bentuk, warna dan tepi yang sama atau tidak. Setelah mendapatkan koloni tunggal yang benar-benar berbeda dipastikan kembali untuk melihat koloni tersebut sudah murni. Bakteri ditumbuhkan kembali pada media TSB dan diinkubasi selama 16-18 jam di atas shaker. Bakteri yang tumbuh kemudian disebar pada media LBA dengan pengenceran $10^{-6} - 10^{-7}$ sebanyak 100 μ l dengan menggunakan mikropipet lalu diinkubasi selama 24 jam. Isolat murni yang didapat kemudian diamati bentuk morfologinya yang meliputi bentuk, warna, tepi dan ukuran.

3.3.2 Uji Aktivitas Bakteri Kandidat Probiotik Penghambat Pertumbuhan *V. harveyi*

Aktivitas daya hambat bakteri dapat dilihat dari adanya zona hambat (daerah bening) di sekitar paper disk. Zona hambat kemudian diukur menggunakan jangka sorong (Wardani *et. al*, 2013).

Semua isolat murni yang diperoleh diuji daya hambatnya terhadap *V. harveyi* secara *in vitro*, yakni dengan mengamati diameter zona hambat pada media LBA. Masing - masing sebanyak 1 ose isolat bakteri dan *V. harveyi* disuspensikan ke dalam 500 μ l larutan fisiologis (NaCl 0,85%) steril di dalam tabung *ependorf*. Selanjutnya sebanyak 50 μ l suspensi *V. harveyi* disebar pada media LBA dan dibiarkan sampai kering. Paper disk steril dengan diameter 5 mm diletakkan di atas media LBA yang

telah ditebarkan *V. harveyi* dan kemudian sebanyak 5µl suspensi isolat bakteri diteteskan di atas paper disk tersebut. Setelah di inkubasi dalam inkubator selama 24 jam, zona hambat yang terbentuk diamati dan diukur diameternya (Widanarni *et. al.* 2008).

3.3.3 Identifikasi Bakteri Kandidat Probiotik Penghambat Pertumbuhan *Vibrio harveyi*

Identifikasi bakteri dilakukan secara konvensional dengan pengamatan morfologi dan uji biokimiawi, yaitu : uji Gram dengan KOH 3%, uji Katalase, uji Oksidatif Fermentatif, uji *Methyl Red* (MR), uji *Simmon's Citrate*, uji TSIA, uji Fermentasi Karbohidrat dan uji Motilitas. Identifikasi bakteri dilakukan dengan langkah-langkah berikut ini :

3.3.3.1 Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri Kandidat Probiotik

Pengamatan morfologi koloni bakteri dilakukan setelah mendapatkan biakan murni. Pengamatan ini meliputi warna, bentuk, tepian koloni, elevasi atau permukaan koloni dan struktur dalam koloni.

3.3.3.2 Pengamatan Morfologi Bakteri dengan Pewarnaan Sederhana

Pengamatan morfologi pada bakteri dilakukan dengan cara pewarnaan sederhana yang bertujuan untuk mengamati struktur sel. Pewarnaan sederhana dilakukan dengan cara membuat preparat ulas yang diberi larutan *Methylene Blue*

yang dibiarkan selama 30 menit, setelah itu preparat dicuci dan dikeringkan menggunakan kertas saring. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop cahaya.

3.3.3.3 Uji Gram dengan KOH 3%

Uji Gram bertujuan untuk menentukan apakah bakteri tersebut termasuk di dalam kelompok bakteri Gram positif atau kelompok bakteri Gram negatif. Uji Gram dengan KOH ini dilakukan dengan cara satu tetes KOH 3% dicampurkan dengan isolat bakteri yang berumur 18-24 jam. Hasil yang terbentuk menunjukkan bakteri Gram positif apabila campuran menjadi viscus atau seperti lem, sedangkan bakteri Gram negatif tidak menjadi viscus (Abegaz, 2007).

3.3.3.4 Uji Katalase

Tujuan uji katalase adalah untuk mengetahui sifat bakteri dalam menghasilkan enzim katalase. Cara kerja dari uji katalase yaitu dilakukan diatas kaca preparat dengan cara satu tetes H_2O_2 3% dicampurkan dengan isolat bakteri umur 18-24 jam. Hasil positif menunjukkan adanya gelembung gas, sedangkan hasil negatif tidak menunjukkan adanya gelembung gas.

3.3.3.5 Uji O/F (Oksidatif/Fermentatif)

Uji O/F medium (Oksidatif/Fermentatif) bertujuan untuk mengetahui sifat oksidasi atau fermentasi bakteri terhadap glukosa dengan menggunakan dua tabung media yang salah satunya ditutup dengan parafin, sehingga diharapkan di dalam media tidak terdapat udara yang dapat mendukung terjadinya fermentasi. Uji O/F

dilakukan dengan cara bakteri diinokulasi pada media oksidatif (media tanpa parafin) dan media fermentatif (media dengan parafin) dengan cara ditusukkan. Selanjutnya bakteri diinkubasi selama 24-48 jam dan diamati perubahan warna yang terbentuk.

3.3.3.6 Uji *Methyl Red* (MR)

Uji MR bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri menghasilkan asam dari fermentasi glukosa. Uji MR dilakukan dengan cara reagen MR diteteskan pada pada biakan bakteri kemudian diamati perubahan warna yang terbentuk. Hasil positif ditunjukkan oleh warna merah, sedangkan hasil negatif tetap berwarna kuning.

3.3.3.7 Uji *Simmon's Citrate*

Uji *Simmon's Citrate* bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri tumbuh menggunakan sumber karbon dari citrate (*enzyme citrate*). Uji *Simmon's Citrate* dilakukan dengan cara mengambil satu koloni terpisah dengan menggunakan jarum ose dan diinokulasikan pada media *Simmon's Citrate* lalu diinkubasi pada temperatur 37 °C selama 24 jam. Diamati adanya perubahan warna pada medium biakan, Hasil positif ditandai dengan berubahnya warna medium menjadi biru.

3.3.3.8 Uji *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA)

Uji TSIA bertujuan untuk mengetahui mikroba dalam memfermentasikan glukosa, sukrosa, dan laktosa yang terkandung didalam medium. Uji TSIA dilakukan dengan cara mengambil 1 koloni isolat bakteri dengan menggunakan ose dan diinokulasikan pada media TSIA, kemudian dilakukan dengan cara menusuk tegak

lurus pada bagian *butt* (tusuk) dan cara zig zag pada bagian *slant* (miring). Diinkubasi pada temperatur 37 °C selama 24 jam. Diamati perubahan warna medium yang terjadi. Apabila bagian *slant* berwarna merah dan *butt* berwarna kuning maka bakteri mampu memfermentasi glukosa, sedangkan apabila bagian *slant* dan *butt* keduanya berwarna kuning maka bakteri mampu memfermentasi sukrosa dan laktosa.

3.3.3.9 Uji Motilitas

Uji motilitas yaitu untuk melihat pergerakan dari bakteri. Pergerakan bakteri dapat dilihat dengan adanya kekeruhan di sekitar tusukan pada media. Uji motilitas dilakukan dengan mengambil satu ose bakteri ditanam secara tegak lurus di tengah Medium MIO (*Motility Indol Ornithin*) dengan cara ditusukkan, diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Uji positif ditandai dengan pertumbuhan bakteri yang menyebar, maka bakteri tersebut bergerak (motil) dan bila pertumbuhan bakteri tidak menyebar hanya berupa satu garis, maka bakteri tersebut tidak bergerak (non motil).

3.3.4 Pembacaan Hasil Uji Identifikasi Bakteri Kandidat Probiotik

Identifikasi dilakukan berdasarkan acuan metode *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*. Penilaian berdasarkan kecocokannya paling tinggi atau mendekati 100%, serta dilakukan uji perbandingan sampel isolat ke Balai Veteriner Lampung dan Stasiun Karantina Ikan, Panjang, Lampung.

3.3.5 Uji Patogenisitas Bakteri Kandidat Probiotik Penghambat Pertumbuhan *V. harveyi*

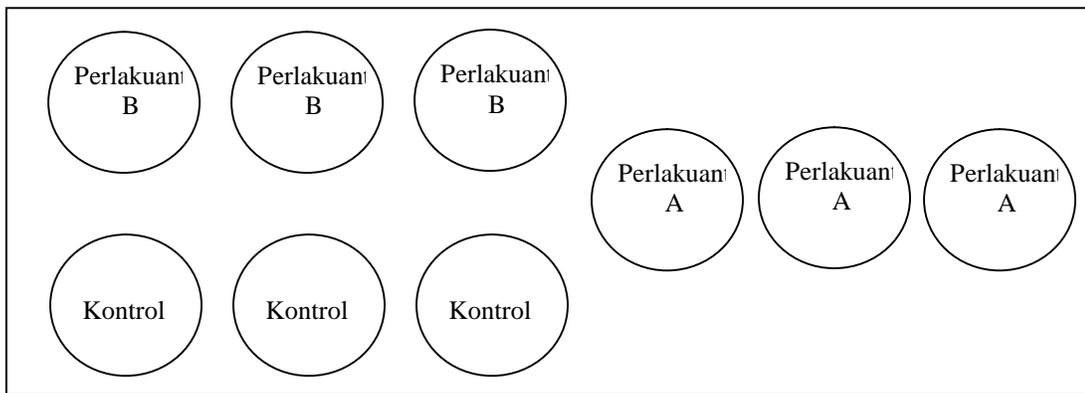
Setelah dilakukan uji aktivitas bakteri secara *in vitro*. Selanjutnya dilakukan uji patogenisitas terhadap larva udang vannamei. Uji patogenisitas dilakukan melalui

uji LC₅₀ untuk mengetahui pada konsentrasi berapa isolat bakteri kandidat probiotik bersifat patogen. Isolat bakteri kandidat probiotik diinokulasi pada media TSB kemudian diinkubasi di shaker dengan suhu ruangan 30 – 31 °C selama (16-18 jam). Pengujian dilakukan dengan menambahkan suspensi isolat bakteri penghambat berkonsentrasi, 10⁴, 10⁶ dan 10⁸ CFU/ml pada media pemeliharaan larva udang. Larva udang dipelihara dalam toples dengan volume 3 liter, yang diisi dengan 2 liter air laut dengan kepadatan 125 ekor/l dan diberi pakan Algae *Chaetoceros* sp., *Artemia* sp. dan pellet CP 01, dengan frekuensi pemberian sebanyak 3 kali/hari. Pemeliharaan larva udang dilakukan selama 7 hari dengan parameter pengamatan yaitu tingkat kelangsungan hidup. Pada akhir pemeliharaan dihitung kelangsungan hidup larva udang dan dibandingkan dengan kontrol, yakni perlakuan tanpa penambahan isolat bakteri yang mampu menghambat pertumbuhan *V. harveyi* (Widanarni *et. al.* 2008).

3.3.6 Uji Tantang Isolat Bakteri Kandidat Probiotik dari Suplemen Terhadap *V. harveyi* pada Larva Udang Vannamei (*Shrimp Bioassay*)

Isolat bakteri yang berasal dari sampel suplemen tambak diuji kembali efektivitasnya dalam menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi* yaitu bakteri patogen pada larva udang. Pengujian dilakukan setelah mendapatkan dosis LC₅₀ yang dilihat dari uji patogenisitas, dan dilanjutkan ke uji tantang terhadap larva udang vannamei. Konsentrasi isolat bakteri yang digunakan pada uji tantang ini yaitu 10⁸ CFU/mL. Pemeliharaan dilakukan di dalam toples dengan volume 3 liter air yang diisi dengan volume 2 liter air laut, dengan kepadatan 125ekor/l dan diberi pakan Algae *Chaetoceros* sp, *Artemia* sp. dan pellet CP 01 dengan frekuensi

pemberian sebanyak 3 kali/hari dan pengamatan dilakukan selama 7 hari. Parameter yang di amati dalam penelitian ini adalah untuk melihat kelangsungan hidup dan *Total Vibrio Count* (TVC). Pengamatan dilakukan menggunakan media TCBS untuk melihat kepadatan bakteri *V. harveyi* pada media pemeliharaan. Kelangsungan hidup di amati pada akhir percobaan dan TVC di amati setiap hari selama percobaan (Widanarni *et., al.* 2008). Tata letak wadah pemeliharaan udang vannamei dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Tata letak wadah pemeliharaan pada uji tantang isolat bakteri