
METODE PENYIMPANAN BAKTERI *Vibrio alginolyticus* dan *Vibrio harveyi* DALAM MEDIA TSB (*Tryptic Soy Broth*) DAN GLISEROL

Huyyirnah^{1*}, Fitriyani²

¹ Lab. Mikrobiologi Laut, Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan, Universitas Hasanuddin

² Lab. Produktivitas dan Kualitas Perairan, Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan, Universitas Hasanuddin
Jl. Perintis Kemerdekaan KM 10, Tamalanrea Makassar 90245 Telp.(0411) 586-025

*Email: huyyirnah@yahoo.com

ABSTRAK

Berbagai macam kajian atau penelitian yang dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Laut Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Hasanuddin sebagian besar menggunakan isolat mikroba sebagai bahan ujinya. Oleh karena itu, perlu melakukan koleksi, menyimpan dan memelihara mikroba dengan baik. Bakteri penting yang sering digunakan adalah *Vibrio alginolyticus* dan *Vibrio harveyi*. Kedua bakteri ini membutuhkan penanganan yang baik dan preservasi yang layak sehingga viabilitasnya tetap terjaga. Maka penting untuk dilakukan penelitian untuk menemukan metode yang tepat penyimpanan bakteri *V. alginolyticus* dan *V. harveyi* dalam medium TSB (*Tryptic Soy Broth*) dan gliserol. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen dengan menggunakan 2 jenis bakteri dan 4 taraf perlakuan, masing-masing perlakuan dengan 3 kali ulangan. Perlakuan penelitian terdiri dari TSB + gliserol 10%, 15%, 20%, 25% disimpan pada suhu -20°C selama 56 hari. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri *V. harveyi* efektif dan memiliki daya tumbuh tertinggi selama penyimpanan dalam media TSB dengan gliserol 10% pada suhu -20°C, sedangkan bakteri *V. alginolyticus* pada media TSB dengan gliserol 10%-15% pada suhu -20°C. Waktu penyimpanan efektif bagi bakteri *V.harveyi* dan *V. alginolyticus* adalah pada hari ke-14 hingga hari ke-28. Kata kunci: Penyimpanan, gliserol, TSB, *V.alginolyticus*, *V. harveyi*

ABSTRACT

Various kinds of studies or research conducted at the Marine Microbiology Laboratory of the Faculty of Marine and Fisheries Sciences, Hasanuddin University mostly use microbial isolates as test materials. Therefore, it is necessary to collect, store and maintain microbes properly. Important bacteria that are often used are Vibrio alginolyticus and Vibrio harveyi. Both of these bacteria require good handling and proper preservation so that their viability is maintained. So it is important to do research to find the right method of storing V. alginolyticus and V. harveyi bacteria in TSB (Tryptic Soy Broth) and glycerol medium. The method used in this research is an experimental method using 2 types of bacteria and 4 levels of treatment, each treatment with 3 replications. The treatments consisted of TSB + glycerol 10%, 15%, 20%, 25% stored at -20°C for 56 days. The results showed that V. harveyi was effective and had the highest growth power during storage in TSB media with 10% glycerol at -20 ° C, while V. alginolyticus on TSB media with glycerol 10% -15% at -20 ° C. The effective storage time for V.harveyi and V. alginolyticus bacteria is on day 14 to day 28.

Key words: storage, glycerol, TSB, V. alginolyticus, V. Harvey

LATAR BELAKANG

Laboratorium pendidikan yang berada di lingkungan Universitas Hasanuddin senantiasa selalu berupaya untuk berkontribusi dalam kegiatan tri dharma perguruan tinggi yaitu melayani kegiatan pendidikan melalui praktikum, kegiatan penelitian dan kegiatan pengabdian kepada masyarakat. Pelayanan ini sejalan dengan visi Universitas Hasanuddin sebagai pusat pengembangan insani, ilmu pengetahuan, teknologi, seni dan budaya berbasis Benua Maritim Indonesia (BMI) yang dicanangkan sejak tahun 2010, telah menjadi spirit dan pedoman bagi warga Unhas di dalam melaksanakan kegiatan tri dharma (Borang Akreditasi Unhas, 2017).

Salah satu kajian yang menarik dilakukan oleh peneliti adalah kajian tentang potensi berbagai macam biodiversitas mikroba, baik mikroba yang menguntungkan maupun mikroba yang merugikan atau mikroba patogen. Berbagai macam kajian atau penelitian di Laboratorium Mikrobiologi Laut Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Hasanuddin sebagian besar menggunakan isolat mikroba sebagai bahan ujinya. Baik dalam melakukan diagnosa maupun sebagai isolat uji. Salah satu diantaranya adalah isolat bakteri vibrio. Bakteri *Vibrio alginolyticus* dan *Vibrio harveyi* adalah jenis bakteri yang sering digunakan oleh para peneliti di Laboratorium Mikrobiologi Laut FIKP. Bakteri ini digunakan sebagai bakteri uji dalam berbagai penelitian dan juga digunakan dalam kegiatan praktikum Mikrobiologi Laut, Bahan Alam Laut dan Parasit dan Penyakit Biota Laut.

Diagnosa merupakan usaha untuk mengetahui jenis bakteri penyebab penyakit. Ketepatan dan kecepatan diagnosa merupakan kunci bagi usaha penanggulangan penyakit. Pengamatan gejala penyakit, identifikasi patogen untuk tujuan diagnosis termasuk bakteri sering tidak dapat dilakukan secara langsung dan segera. Oleh karena itu, perlu melakukan koleksi, menyimpan dan memelihara mikroba dengan baik. Pengetahuan tentang teknik penyimpanan isolat bakteri yang baik selain berguna untuk peningkatan mutu hasil pemeriksaan, bahan koreksi, bahan uji, bahan pembanding, sebagai isolat rujukan juga merupakan suatu upaya memperkaya inventarisasi bakteri di laboratorium.

Koleksi dan preservasi (penyimpanan) meliputi tujuan jangka pendek dan jangka panjang. Penyimpanan jangka pendek dilakukan untuk keperluan rutin penelitian yang disesuaikan dengan kegiatan program tertentu. Penyimpanan jangka panjang dilakukan dalam kaitannya dengan koleksi dan konservasi plasma nutfah mikroba, sehingga apabila suatu saat diperlukan dapat diperoleh kembali atau dalam keadaan tersedia (Machmud, 2001).

Penentuan teknik penyimpanan atau pengawetan mikroba perlu dilakukan, hal ini berkaitan dengan tujuan utama preservasi, yaitu mereduksi atau mengurangi laju metabolisme dari mikroorganisme hingga sekecil mungkin. Dapat mempertahankan viabilitas (daya hidupnya) dan memelihara sebaik mungkin biakan, sehingga diperoleh angka perolehan (recovery) dan kehidupan (survival) yang tinggi dengan perubahan ciri-ciri minimum.

Bakteri penting dan banyak digunakan sebagai bakteri uji di laboratorium mikrobiologi laut adalah *V. alginolyticus* dan *V. harveyi*. Kedua bakteri ini membutuhkan penanganan yang baik dan preservasi yang layak sehingga viabilitasnya tetap terjaga. Maka penting untuk dilakukan penelitian untuk menemukan metode yang tepat penyimpanan bakteri *V. alginolyticus* dan *V. harveyi* dalam media TSB (*Tryptic Soy Broth*) dan Gliserol.

BAHAN DAN METODE

Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui konsentrasi gliserol yang terbaik dalam TSB sebagai media penyimpanan bakteri *V. alginolyticus* dan *V. harveyi*.
2. Mengetahui waktu efektif penyimpanan bakteri *V. alginolyticus* dan *V. harveyi* dalam media TSB dan gliserol.

Tinjauan Pustaka

Bakteri Vibrio

Bakteri Vibrio merupakan bakteri yang menyebabkan penyakit pada hasil perikanan yaitu udang. Bakteri ini menyerang larva udang secara sekunder yaitu saat larva dalam keadaan stress dan lemah, sehingga sering dikatakan sebagai jenis patogen *opportunistic* (Muliani, 2002).

Ada 6 jenis bakteri *Vibrio* yang ditemukan menyebabkan penyakit vibriosis yaitu *Vibrio harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* dan *V. splendidus* (Irianto, 2003). Namun yang sering ditemukan mewabah pada usaha budidaya udang adalah jenis bakteri luminous *Vibrio harveyi* and *V. Parahaemolyticus* (Austin dan Zhang, 2006). *Vibrio harveyi* sering menyerang larva dan juvenil udang windu *P. Monodon* di hatcheri dan di tambak pembesaran. Bakteri ini sering terdeteksi menyerang hepatopankreas udang dan mengakibatkan infeksi akut dan kronis. Penyakit yang ditimbulkan dikenal dengan nama penyakit kunang-kunang atau penyakit udang menyala, karena udang yang terinfeksi bakteri ini akan bercahaya dalam keadaan gelap. Angka kematian yang disebabkan oleh penyakit ini adalah diatas 30% pada larva, post-larva dan dewasa (Le Groumellec dkk., 1996; Jiravanichpaisal dkk., 1994; Baticados dkk., 1990).

Vibrio alginolyticus dicirikan dengan pertumbuhannya yang bersifat swarm pada media padat non selektiif. Ciri lain adalah gram negative, motil, bentuk batang, fermentasi glukosa, laktosa, sukrosa dan maltose. Membentuk koloni berukuran 0,8 - 1,2 cm yang berwarna kuning pada media *Thiosulphate Citrate Bile Salt* (TCBS) (Holt dkk; 1994)

Klasifikasi *V. alginolyticus* adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Proteobacteria
Class	: Gamma Proteobacteria
Ordo	: Vibrionales
Family	: Vibrionaceae
Genus	: Vibrio
Species	: <i>Vibrio alginolyticus</i>

Bakteri *V. harveyi* adalah bakteri gram negatif berbentuk batang dengan ukuran 1,0-1,6 x 0,5-0,7 μm , fermetatif dan memiliki flagel lateral pada salah satu ujung polarnya (Ramesh dkk., 2014). Bakteri ini mempunyai ciri-ciri koloni berwarna putih sampai hijau pada media *Thiosulphate Citrate Bile Salt* (TCBS) dengan diameter 15-17 mm dan pada pusat koloni berwarna hijau tua. Karakteristik lain bakteri *V. harveyi* adalah bersifat patogen oportunistik, yaitu organisme yang dalam keadaan normal ada di lingkungan pemeliharaan yang berkembang menjadi patogen apabila kondisi lingkungan inangnya memburuk (Widanarni dkk; 2012).

Klasifikasi *V. harveyi* adalah sebagai berikut : (Holt dkk; 1994)

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Proteobacteria
Class	: Gamma Proteobacteria

Ordo	: Vibrionales
Family	: Vibrionaceae
Genus	: Vibrio
Species	: <i>Vibrio harveyi</i>

Gliserol

Gliserol adalah senyawa bahan kimia dengan rumus kimia HOCH₂CH(OH)CH₂OH. Tidak berwarna, tidak berbau dan berupa cairan kental yang sering digunakan pada formula obat-obatan. Gliserol sering juga disebut glycerin atau glicerine, biasa disebut gula alkohol merupakan cairan kental dengan titik leleh 18^oC dan titik didih 290^oC, bermassa jenis 1,1261, berasa manis dengan kadar racun rendah. Gliserol dapat mencegah pengumpula molekul-molekul air dan kristalisasi es pada titik beku larutan. Gliserol, seperti banyak zat lain yang memiliki sifat antibeku, benar-benar larut sebagai cairan tetapi bercampur dalam fase padat.

Pelczar & Chan dalam Noviana dan Raharjo (2009), menjelaskan bahwa bertahan hidupnya suatu spesies dan kelangsungan pertumbuhannya di dalam komunitas biologis membutuhkan suatu kemampuan untuk menyesuaikan diri terhadap perubahan keadaan lingkungan. Adaptasi fenotipik merupakan respons mikroba terhadap perubahan terbatas yang bersifat sementara. Selanjutnya, Yuasa dkk., (2003), sub kultur yang berkali-kali dapat menyebabkan kemungkinan bakteri terkontaminasi, juga menurun atau hilangnya patogenisitas bakteri. Hal ini dapat dihindari dengan melakukan penyimpanan atau pengawetan. Salah satu metode penyimpanan bakteri adalah penyimpanan dengan pembekuan. Nitimulyo (1994), pembekuan bakteri (-70^oC) dilakukan agar bakteri menjadi tidak aktif sehingga dapat disimpan dalam waktu lama. Masalahnya adalah kristal es yang dapat merusak sel. Pada penyimpanan dalam deep freezer, kultur murni bakteri dibiakkan pada medium agar yang sesuai. Diinkubasi pada suhu yang sesuai selama 24-48 jam. Pemanenan bakteri dilakukan dengan cara menambahkan medium cair yang mengandung 10-25% gliserol (Aritonang, 2006).

Metode Penelitian

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan mulai dari bulan Juli – September 2020. Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Mikrobiologi Laut Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Hasanuddin.

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoklaf (All American), inkubator (Imperial III), *laminar air flow* (Envirco), *Freezer* (Modena), *hot plate with magnetic stirrer* (EBA), mikropipet (Jencons), mikroskop (Olympus), oven (Jumo), vortex (IKA), timbangan analitik (Sartorius) cawan petri (Ø 90 mm, Pyrex), labu Erlenmeyer (Pyrex), gelas piala (Pyrex), gelas ukur (Pyrex), corong, tabung reaksi.

Bahan-bahan yang digunakan adalah isolat bakteri *Vibrio harveyi*, *Vibrio alginolyticus* media *Thiosulphate Citrate Bile Salt* (TCBSA), *Tryptic Soy Agar* (TSA), *Tryptic Soy Broth* (TSB), NaCl, gliserol, aquades, aluminium foil, masker, gloves, aluminium foil, tisu, kertas label, dan alat tulis menulis.

Prosedur Penelitian

Sterilisasi Peralatan

Alat-alat yang digunakan dicuci bersih dengan deterjen lalu dibilas dengan air kran dan terakhir dengan aquades. Alat tersebut kemudian dikeringkan di oven pada suhu 60 – 70°C. Peralatan yang terbuat dari gelas, disterilkan dalam oven pada suhu 180°C selama 2 jam, sedangkan alat-alat yang tidak tahan pada pemanasan dengan suhu tinggi, disterilkan dalam outoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm selama 15 menit. Jarum ose disterilkan dengan cara pemanasan langsung hingga memijar.

Pembuatan Media dan Peremajaan Bakteri *V. alginolyticus* dan *V. harveyi*

Pembuatan Media TCBS Agar (Atlas, 1993)

Menimbang media TCBS Agar sebanyak 88 g dilarutkan dalam 1000 ml aquades steril, erlenmeyer ditutup dengan menggunakan kapas dan aluminium foil. Dididihkan di atas hotplate sambil diaduk hingga media larut.

Pembuatan Media TSA + 2,5% NaCl (Atlas, 1993)

Menimbang medium TSA sebanyak 40 g dilarutkan dalam 1000 ml aquades ditambahkan 2,5 % NaCl, erlenmeyer ditutup dengan menggunakan kapas dan aluminium foil. Dididihkan di atas hotplate sambil diaduk hingga media larut. Disterilkan dalam autoclave pada suhu 121°C, tekanan 2 atm selama 15 menit.

Pembuatan Media TSB + 2,5% NaCl (Atlas, 1993)

Menimbang medium TSB sebanyak 30 g dilarutkan dalam 1000 ml aquades dan ditambahkan 2,5% NaCl, erlenmeyer ditutup dengan menggunakan kapas dan aluminium foil. Dididihkan di atas hotplate sambil diaduk hingga media media larut. Disterilkan dalam autoclave pada suhu 121°C, tekanan 2 atm selama 15 menit.

Inokulasi bakteri *V. alginolyticus* dan *V. harveyi* dalam media TCBSA dan TSA plate.

Medium TSA yang telah dibuat selanjutnya dimasukkan kedalam cawan petri steril masing-masing 20 ml dan dibiarkan memadat. Membersihkan kawat ose dengan menggunakan alkohol, serta mengambil isolat bakteri *Vibrio* lalu digores di dalam medium plate dengan metode kuadran. Inkubasikan selama 24 jam dengan suhu 28°C.

Inokulasi bakteri *V. alginolyticus* dan *V. harveyi* dalam media TSB.

Mempersiapkan 20 ml media TSB dalam tabung reaksi. Membersihkan kawat ose dengan menggunakan alkohol. Mengambil 5 ose isolat bakteri *Vibrio*, lalu memasukkannya ke dalam media TSB. Vortex medium hingga tercampur dengan bakteri *Vibrio* tersebut. Inkubasikan selama 24 jam dengan suhu 28°C.

Inokulasi Bakteri dalam Medium TSB dan Gliserol

Bakteri *V. alginolyticus* dan *V. harveyi* diinokulasikan ke dalam media TSB yang mengandung gliserol 10%, 15%, 20% dan 25 %. lalu dihomogenkan dengan menggunakan vortex selanjutnya disimpan dalam freezer suhu -20 C selama 56 hari.

Perhitungan Jumlah Koloni Bakteri (SNI, 2006)

Perhitungan jumlah koloni bakteri dilakukan pada hari ke-1, 14, 28, 42 dan 56. Sampel dipipet 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml air pengencer NaCl 0,9 % ini adalah pengenceran 10^{-1} . Kemudian campuran dikocok hingga homogen. Lalu dipipet sebanyak 1 ml dari pengenceran 10^{-1} dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi 9 ml larutan

NaCl 0,9 ml (pengenceran ⁻²). Selanjutnya dilakukan hal yang sama sampai tingkat pengenceran ⁻⁸. Lalu dipipet masing-masing 1 ml dari pengenceran yang telah dibuat ke dalam cawan petri steril secara duplo. Kemudian dalam setiap cawan petri dituangkan sebanyak 12-15 ml media TSA yang telah dicairkan pada suhu 45±1 C. Selanjutnya digoyangkan dengan hati-hati (gerakan membentuk angka delapan) hingga tercampur rata. Kemudian ditutup dan didiamkan hingga campuran dalam cawan petri membeku. Semua cawan petri yang telah membeku dimasukkan ke dalam incubator dengan posisi terbalik dan diinkubasikan pada suhu 28°C selama 48 jam. Pertumbuhan koloni dicatat pada setiap cawan petri.

Perhitungan jumlah koloni bakteri sebagai berikut:

$$N = \frac{\Sigma C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2)] \times (d)}$$

Dengan :

N adalah jumlah koloni (cfu/ml)

ΣC adalah jumlah koloni pada semua cawan dihitung

n₁ adalah jumlah cawan pada pengenceran pertama yang dihitung

n₂ adalah jumlah cawan pada pengenceran kedua yang dihitung

d adalah pengenceran pertama yang dihitung

Analisa Data

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metoda eksperimen dengan menggunakan 2 jenis bakteri dan 4 taraf perlakuan, masing-masing perlakuan dengan 3 kali ulangan. Perlakuan penelitian terdiri dari :

P1 = media TSB + gliserol 10% disimpan suhu -20°C

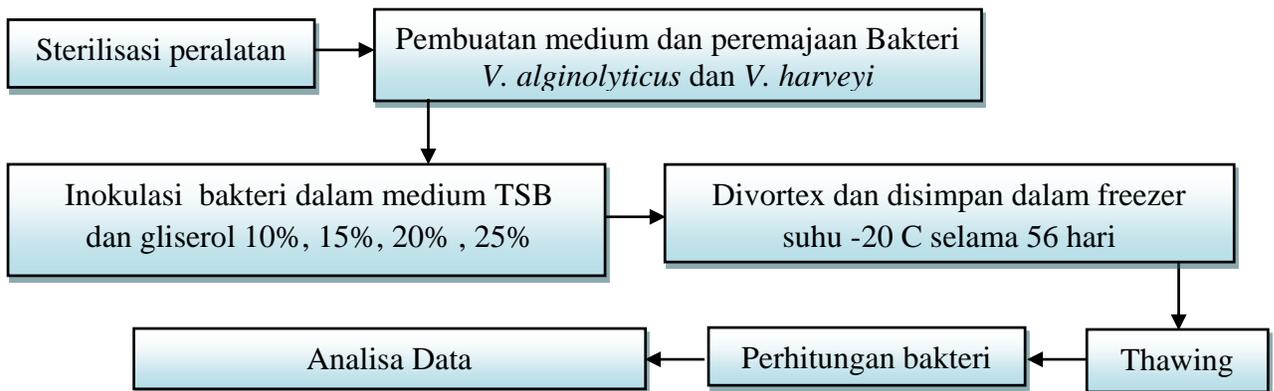
P2 = media TSB + gliserol 15% disimpan suhu -20°C

P3 = media TSB + gliserol 20% disimpan suhu -20°C

P4 = media TSB + gliserol 25% disimpan suhu -20°C

K (kontrol) = tanpa gliserol disimpan suhu -20°C

Data dianalisa secara kuantitatif menggunakan rumus dan disajikan dalam bentuk grafik dan tabel.



Gambar 1. Diagram alir penelitian

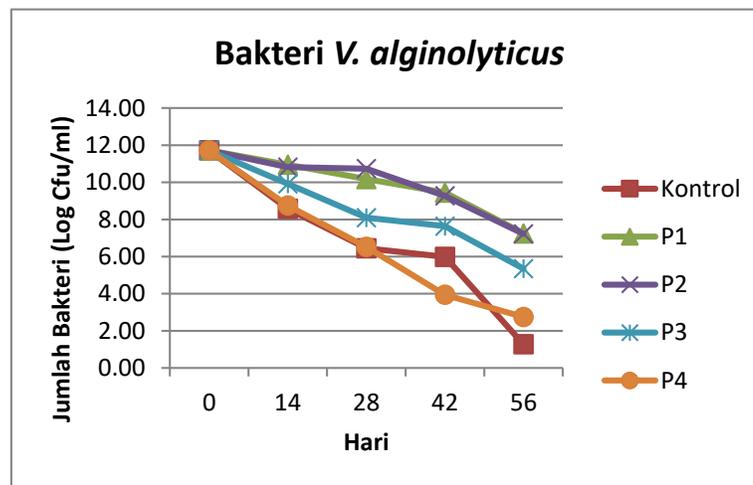
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian berupa data pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus* dan *V. harveyi* dapat dilihat pada tabel dibawah ini:

Tabel 1. Data pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus* selama 56 hari penyimpanan pada suhu -20°C

Hari ke-	Jumlah koloni bakteri (CFU/ml)				
	Kontrol (tanpa Gliserol)	TSB+Gliserol 10% (P1)	TSB+Gliserol 15% (P2)	TSB+Gliserol 20% (P3)	TSB+Gliserol 25% (P4)
1	$5,25 \times 10^{11}$	$5,25 \times 10^{11}$	$5,25 \times 10^{11}$	$5,25 \times 10^{11}$	$5,25 \times 10^{11}$
14	$3,70 \times 10^8$	$8,90 \times 10^{10}$	$6,54 \times 10^{10}$	$8,23 \times 10^9$	$5,60 \times 10^8$
28	$2,80 \times 10^6$	$1,50 \times 10^{10}$	$5,43 \times 10^{10}$	$1,24 \times 10^8$	$3,32 \times 10^6$
42	$9,70 \times 10^5$	$2,80 \times 10^9$	$1,87 \times 10^{10}$	$4,34 \times 10^7$	$8,76 \times 10^3$
56	$1,90 \times 10^1$	$1,75 \times 10^7$	$1,67 \times 10^7$	$2,22 \times 10^5$	$5,60 \times 10^2$

Perhitungan dengan metode jumlah koloni dilakukan untuk mengetahui jumlah bakteri yang hidup saja. Hasil pengamatan pertumbuhan bakteri *V. Alginolyticus* selama penelitian dapat dilihat pada Tabel 1. Data ini menunjukkan konsentrasi gliserol dan pengenceran maksimum yang masih mendukung tumbuhnya bakteri. Dari tabel tersebut menunjukkan bahwa kemampuan bakteri yang disimpan menggunakan gliserol dengan konsentrasi yang berbeda memberikan daya tumbuh yang berbeda. Pada hari ke-1 bakteri yang diinokulasikan mempunyai kepadatan yang sama pada seluruh perlakuan, yaitu $5,25 \times 10^{11}$. Data pertumbuhan bakteri menunjukkan perbedaan dari setiap perlakuan.



Gambar 2. Grafik jumlah bakteri *V. alginolyticus* selama 56 hari penyimpanan pada suhu -20°C dalam media TSB + Gliserol ; P1=10%, P2=15%, P3=20%, P4=25%.

Bakteri *V. alginolyticus* yang disimpan dengan gliserol 10% (P1) dan 15% (P2) memiliki pola daya tumbuh yang sama, terlihat pada hari ke-14 dan ke-28 bakteri yang disimpan. Pada Gambar 1, grafik menunjukkan bahwa pertumbuhan bakteri ini pada perlakuan kontrol, P3 dan P4 menunjukkan pola menurun dimana bakteri yang disimpan pada gliserol 20% dan 15% proses

osmosis tidak berjalan dengan baik sehingga banyak bakteri yang rusak/mati, sehingga daya tumbuh bakteri rendah dan kepadatan bakteri yang dihasilkan juga rendah. Sebaliknya pada bakteri yang disimpan dengan gliserol 10% dan 15%, proses osmosis dapat berjalan dengan lebih baik sehingga proses penyimpanan bakteri dapat berlangsung dengan baik. Akibatnya daya tumbuh bakteri serta populasi bakteri yang dihasilkan dari biakan ini lebih tinggi, dari pada bakteri yang disimpan dengan gliserol 20% dan 25%.

Dalam penelitian ini bakteri *V. alginolyticus* dapat mempertahankan daya tumbuhnya hingga pada hari ke-28 pada gliserol 10% (P1) dan 15% (P2). Hasil ini didukung oleh penelitian Simanjuntak dkk (2008) bahwa preservasi bakteri *A. salmonicida* pada suhu -20°C dengan menggunakan gliserol konsentrasi 15 - 20% dapat bertahan selama 5 bulan sedangkan pada konsentrasi gliserol 10% dan 25% dapat bertahan selama 4 bulan tanpa menyebabkan terjadinya mutasi dan tidak mengubah karakteristik bakteri.

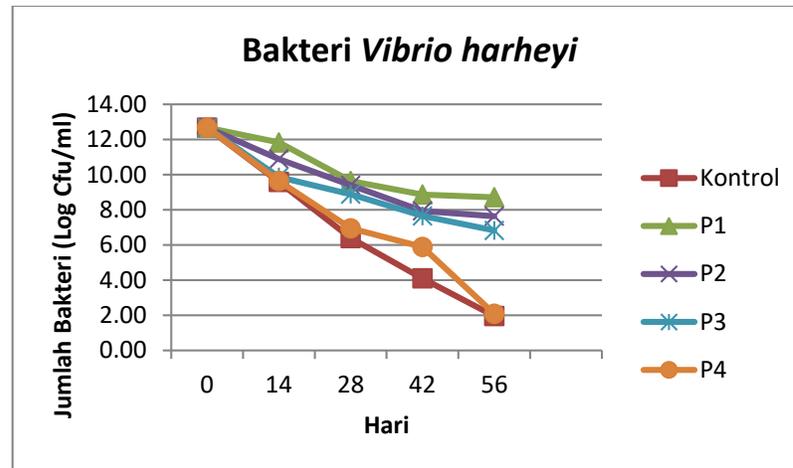
Tetapi hal ini dapat memberikan gambaran kepada kita bahwa setiap bakteri akan mempunyai kemampuan berbeda terhadap penyimpanan pada suhu dingin. Namun hasil penelitian yang mengatakan penyimpanan bakteri pada penyimpanan gliserol 15% telah pula dinyatakan oleh Setiaji dkk (2015) yang menyatakan bahwa bakteri *A. hydrophila* efektif disimpan dalam gliserol dengan konsentrasi 15% dan 20%.

Selanjutnya data pertumbuhan bakteri *V. harveyi* pada tabel 2 menunjukkan penurunan yang sangat signifikan mulai dari awal pengamatan pada setiap perlakuan. Kondisi ini kemungkinan terjadi karena proses metabolisme pada bakteri tidak berhenti secara total selama proses penyimpanan berlangsung. Hal lain yang mungkin menjadi penyebab turunnya populasi bakteri adalah karena adanya penurunan suhu yang cepat pada proses penyimpanan di dalam freezer. Seperti halnya dengan daya tumbuh bakteri, tinggi rendahnya populasi bakteri juga dipengaruhi oleh proses osmosis yang terjadi.

Tabel 2. Pertumbuhan bakteri *V. harveyi* selama 56 hari penyimpanan pada suhu -20°C

Hari ke-	Jumlah koloni bakteri (CFU/ml)				
	Kontrol (tanpa Gliserol)	TSB+Gliserol 10%	TSB+Gliserol 15%	TSB+Gliserol 20%	TSB+Gliserol 25%
0	$4,67 \times 10^{12}$	$4,67 \times 10^{12}$	$4,67 \times 10^{12}$	$4,67 \times 10^{12}$	$4,67 \times 10^{12}$
14	$3,81 \times 10^9$	$6,77 \times 10^{11}$	$7,65 \times 10^{10}$	$7,29 \times 10^9$	$4,32 \times 10^9$
28	$2,45 \times 10^6$	$4,31 \times 10^9$	$2,49 \times 10^9$	$7,66 \times 10^8$	$8,76 \times 10^6$
42	$1,24 \times 10^4$	$7,32 \times 10^8$	$8,60 \times 10^7$	$4,43 \times 10^7$	$7,64 \times 10^5$
56	$9,00 \times 10^1$	$5,13 \times 10^8$	$4,32 \times 10^7$	$6,67 \times 10^6$	$1,20 \times 10^2$

Perbedaan pertumbuhan bakteri ini dipengaruhi oleh beberapa hal, antara lain: tekanan osmosis bakteri dengan krioprotektan, nutrisi, penurunan suhu dan proses thawing (pencairan isi tube). Terjadinya penurunan pertumbuhan bakteri menunjukkan bahwa sebagian dari bakteri yang disimpan tersebut sudah mengalami kematian, sehingga hanya tumbuh sebagian. Bakteri *V. harveyi* adalah bakteri gram negatif dengan lapisan dinding sel yang tipis. Bila bakteri dalam keadaan hipertonik terhadap lingkungan maka air dalam sel akan keluar menembus dinding sel dan sel akan mengalami absorpsi dan kematian. Sebaliknya apabila bakteri dalam keadaan hipertonik maka air cairan krioprotektan akan masuk menembus dinding sel. Masuknya air ke dalam sel karena proses osmosis ini menyebabkan perubahan kerusakan membran sel.



Gambar 3. Grafik jumlah bakteri *V. harveyi* selama 56 hari penyimpanan pada suhu -20°C dalam media TSB + gliserol ; P1=10%, P2=15%, P3=20%, P4=25%.

Bakteri *V. harveyi* memiliki daya tumbuh yang baik pada gliserol 10% (P1) Karena terlihat nilai penurunan terkecil hingga pada hari ke-14 yaitu dari jumlah bakteri awal yaitu $6,77 \times 10^{11}$ dan pada hari ke-28 masih mempertahankan dalam jumlah bakteri $4,31 \times 10^9$ yang merupakan nilai yang tertinggi dari semua perlakuan pada hari yang sama. Sehingga dapat terlihat bahwa dibandingkan perlakuan kontrol, P2, P3 dan P4 maka bakteri *V. harveyi* efektif pada penyimpanan gliserol 10%. Hal ini juga sama dengan hasil penelitian Maria (2020) bahwa dengan penyimpanan gliserol 10% mampu mempertahankan kualitas dan dan evektifitas dari bakteri *S. solanacearum*, sehingga dapat direkomendasikan untuk penyimpanan isolat bakteri dalam jangka waktu menengah.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

1. Bakteri *V. harveyi* efektif dan memiliki daya tumbuh tertinggi selama penyimpanan dalam medium TSB dengan gliserol 10% pada suhu -20°C , sedangkan bakteri *V. alginolyticus* pada medium TSB dengan gliserol 10% hingga 15% pada suhu -20°C .
2. Waktu penyimpanan efektif bagi bakteri *V. harveyi* dan *V. alginolyticus* adalah pada hari ke-14 hingga hari ke-28.

Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, disarankan untuk melakukan penelitian penyimpanan bakteri dengan konsentrasi yang sama menggunakan suhu yang lebih rendah yaitu -70°C sehingga dapat menyimpan bakteri dalam jangka waktu yang lebih lama.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh skim Penelitian Tenaga Kependidikan Fungsional (PTKF) Tahun 2020 Universitas Hasanuddin dengan nomor kontrak : 13454/UN4.3/PT.01.02/2020. Terima kasih dan penghargaan disampaikan kepada pihak Universitas Hasanuddin, juga kepada teman sejawat PLP Universitas Hasanuddin, serta berbagai pihak yang telah berkontribusi dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Atlas, R. M. 1993. Handbook of Microbiological Media. CRC Press. Boca Raton, Florida ISBN: 0-8493-2944-2
- Aritonang, A. H. 2006. Penyakit Bakterial pada Ikan, Teknis Pembuatan dan Pemeliharaan Koleksi HPIK Golongan Bakteri. Balai Uji Standar Karantina Ikan, Jakarta.
- Badan Standardisasi Nasional. 2006. Pengujian Angka Lempeng Total Produk Perikanan. SNI 01-2332.3-2006.
- Austin, B., X. H. Zhang. 2006. Under the microscope. *Vibrio haerveyi* : a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. Letters in Applied Microbiology 43(2): 119-124.
- Mahmud, M. 2001. Teknik Penyimpanan dan Pemeliharaan Mikroba. Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan Bogor. Agrobio, 4(1): 24-32
- Baticados, M., Lavilla-Pitogo, C., Cruz-Lacierda, E., de la Pena, L., and Sunaz, N. 1990. Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi* and *V. splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. Dis Aquat Organ 9(2):133-139.
- Herdis, Kusuma I., M. Surachman, R. E. .2003. Optimalisasi Kualitas Semen Beku Domba Garut dengan Pemberian Glycerol. Prosiding Seminar Teknologi untuk Negeri, Vol II. Bogor.
- Holt, J.G, N.R Krieg, P.H.A Sneath, J.T Staley and S.T Williams. 1994. Bergeys Manual of Determinative Bacteriology. Ninth Edition. Williams and Wilkins. Baltimore.
- Irianto, A. 2003. Probiotik Akuakultur. Yogyakarta: Gadjahmada University Press.
- Jiravanichpaisal, P, Miyazaki, T, and Limsuwan, C. 1994. Histopathology, biochemistry, and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger prawn *Penaeus monodon*. J Aquat Anim Health 6(1): 27-35.
- Le Groumellec, M., Goarant, C., Haffner, P., Mermoud, I. and Costa, R. 1996. Study of episodes of mortality observed in reared *Penaeus stylirostris* since 1993 in New Caledonia : Investigation of the bacterial hypothesis by experimental infections, with reference to stress-induced mortality. In World Aquaculture Society (Editor), World Aquaculture.
- Maria. A. 2020. <http://balaisurabaya.dijen.pertanian.go.id>. [15 September 2020].
- Nitimulyo, K.H. 1994. Preservasi Bakteri. Pelatihan Metode Standar Pemeriksaan HPIK, 21-26 April 2008. Yogyakarta.
- Noviana, L. dan B. Rahardo, 2009. Viabilitas Rhizobakteri *Bacillus* sp. DUCC-BR-KI.3 pada Media Pembawa Tanah Gambut Disubstitusi dengan Padatan Limbah Cair Industri Rokok. BIOMA, 2(1): 30-39.
- Ramesh, K. . M. Natarajan, H. Sridar and S. Umamaheswari. 2014. Virulence Determination among *Vibrio harveyi* Hatchery Isolates Through Haemolysis and Growth Constraint. Global Journal of Bio-Science and Biotechnology. 3(1): 109-114.

- Setiaji, J. T.I. Johan dan M. Widantari. 2015. Pengaruh Gliserol Pada Media Tryptic Soy Broth (TSB) Terhadap Viabilitas bakteri *Aeromonas hydrophila*. Jurnal Dinamika Pertanian Volume XXX Nomor 1 April 2015 (83 - 91) P: ISSN 0215-25 E: ISSN 2549-7960
- Widanarni, D. Wahjuningrum, F. Puspita. 2012. Apikasi bakteri Probiotik Melalui Pakan Buatan Untuk Meningkatkan KInerja Pertumbuhan Udang Windu *Penaeus monodon*. Jurnal Sains Terapan. 2(1): 32-49.
- Yuasa, K., N. Panigoro, M. Bahnan, dan E. B. Kholidin. Panduan Diagnosa Penyakit Ikan Budidaya Air tawar di Indonesia. Angkasa. BBAT Jambi.