

## PENGARUH GLISEROL PADA MEDIA *TRYPTIC SOY BROTH* (TSB) TERHADAP VIABILITAS BAKTERI *Aeromonas hydrophila*

### Effect of Glycerol at the Tryptic Soy Broth (TSB) Media on *Aeromonas hydrophila* Bacteria Viability

Jarod Setiaji<sup>1</sup>, T. Iskandar Johan<sup>1</sup> dan Meliya Widantari<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Pertanian Universitas Islam Riau Jl. Khaharuddin Nasution No.113 Pekanbaru. 28284  
Telp: 0761-674681; Fax: 0761-674681

<sup>2</sup>Stasiun Karantina Ikan, Pengendali Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Kelas I Pekanbaru  
[Diterima Januari 2015, Disetujui Februari 2015]

#### ABSTRACT

The effect of glycerol at the TSB media on *Aeromonas hydrophila* bacteria viability was studied. The purpose of this study was to obtain the best glycerol concentration in TSB as storage media for *Aeromonas hydrophila* bacteria. The completely randomized design with one factor was used for four treatments and three replications, i.e., TSB media added glycerol 10%, 15%, 20% and 25%. The stage of this research included media preparation, preliminary test, glycerol preparation, inoculation on kryotube, and test bacteria inspection. The test results showed the highest bacteria growth capacity was found on bacteria stored in TSB that was added with glycerol under concentration of 15%, namely  $5.77 \times 10^7$  CFU/ml and the lowest one in TSB that was added gluserol 25%, experiencing total death on 56<sup>th</sup> day. The largest percentage of bacteria viability during storage was obtained on 15% glycerol increment, accounting for 0.01015%, and the lowest one was found on 115% glyserol increment, namely 0%. The *aeromonas hydrophila* bacteria storage with using glycerol concentration for 10%, 15%, 20% and 25% on temperature  $-20^{\circ}$  C during 56 days did not cause to be occured mutation and change the bacteria charactristics. Percentage of suitable bacteria on mother T (0) was 100%.

**Keywords:** *Glycerol, Tryptic Soy Broth, Bakteria Viability, Aeromonas hydrophila*

#### ABSTRAK

Pengaruh pengaruh gliserol pada media TSB terhadap viabilitas bakteri *Aeromonas hydrophila*. Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan konsentrasi gliserol yang terbaik dalam TSB sebagai media penyimpanan bakteri *Aeromonas hydrophila*. Penelitian ini menggunakan metode eksperimen dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) Satu faktor dengan 4 taraf perlakuan dan 3 kali ulangan, yaitu Media TSB yang ditambah dengan gliserol 10%, 15%, 20%, dan 25%. Tahapan penelitian ini meliputi persiapan media, uji pendahuluan, persiapan gliserol, inokulasi pada kriotube dan pemeriksaan bakteri uji. Hasil uji menunjukkan daya tumbuh bakteri yang paling tinggi dijumpai pada bakteri yang disimpan pada TSB yang ditambah dengan gliserol konsentrasi 15% yaitu sebesar  $5,77 \times 10^7$  CFU/ml dan yang terendah pada TSB ditambah gliserol 25%, yang mengalami kematian total pada hari ke-56. Persentase viabilitas bakteri yang tertinggi selama penyimpanan diperoleh pada penambahan gliserol 15% dengan jumlah 0,01015% dan yang terendah adalah pada penambahan konsentrasi gliserol 25% yaitu 0%. Penyimpanan bakteri *Aeromonas hydrophila* dengan menggunakan gliserol konsentrasi 10%, 15%, 20% dan 25% pada suhu  $-20^{\circ}$ C selama 56 hari tidak menyebabkan terjadinya mutasi dan tidak mengubah karakteristik bakteri. Persentase kecocokan bakteri terhadap indukan T(0) adalah 100%.

**Kata kunci:** *Gliserol, Tryptic Soy Broth, Viabilitas bakteri, Aeromonas hydrophila*

#### PENDAHULUAN

Indonesia yang terletak di daerah tropik merupakan sumber biodiversitas yang luas, ter-

masuk mikrobanya baik yang merugikan maupun yang berguna bagi manusia. Mikroba tersebut, disamping beragam jenisnya juga sangat mudah mengalami perubahan sifat

sehingga menjadi strain baru yang berbeda dengan aslinya. Hal ini menambah cepat tumbuh dan berkembangnya biodiversitas tersebut.

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 perbandingan, sebagai isolat rujukan juga merupakan suatu upaya memperkaya inventarisasi jenis-jenis Hama Penyakit Ikan/Hama Penyakit Ikan Karantina yang telah terdeterminasi.

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 *dalam* Badjoeri, 2010).

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.

Permasalahan yang muncul selama penyimpanan dingin tersebut antara lain: pembentukan kristal es, terutama di dalam sel yang secara fisik dapat merobek atau memecahkan sel, atau pembentukan kristal ini akan menyebabkan perubahan komposisi kimia pada bahan yang masih dalam fase cair. Oleh karena itu perlu ditambahkan bahan terlarut seperti krioprotektan yang dapat mencegah terjadinya kristal es dalam sel. Syarat dari krioprotektan ini adalah; Bahan harus larut dalam air, dan tetap larut dalam kondisi suhu dingin. Bahan harus

bisa melakukan penetrasi dalam sel. Bahan mempunyai toksisitas yang rendah sehingga bisa digunakan dalam konsentrasi tinggi.

Media penyimpanan yang sering digunakan selama ini adalah parafin cair. Parafin cair memiliki kelemahan yakni tidak larut dalam media dan toksisitasnya relatif tinggi. Bahan lain yang dapat digunakan sebagai media penyimpanan bakteri adalah gliserol. Gliserol memiliki daya larut yang tinggi dengan media cair triptic soy broth (TSB) walaupun pada kondisi suhu dingin, memiliki daya penetrasi sampai ke dalam sel dan memiliki daya toksisitas yang rendah. Herdis et al. (2003), gliserol mampu mencegah pengumpulan molekul-molekul air dan kristalisasi es pada titik beku larutan. Gliserol juga akan memodifikasi kristal es yang terbentuk di dalam medium pembekuan sehingga menghambat kerusakan sel secara mekanis.

Gliserol adalah senyawa bahan kimia dengan rumus kimia  $\text{HOCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$ . 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  $18^\circ\text{C}$  dan titik didih  $290^\circ\text{C}$ , bermassa jenis 1,261, berasa manis dengan kadar racun rendah. Gliserol dapat mencegah pengumpulan 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. Penelitian yang dilaporkan di sini menunjukkan bahwa bakteri tertentu dapat dibekukan dengan penambahan gliserol tanpa mengalami kerusakan (Hollander dan Nell, 1954).

Gliserol pada umumnya digunakan sebagai media dalam pengawetan atau penyimpanan jangka panjang atau sekedar sebagai media untuk memindahkan mikroorganisme. Gliserol dapat digunakan sebagai media karena gliserol dapat melindungi aktivitas antimikroba dengan cara meningkatkan stabilitas struktur protein asli dari mikroba sehingga dapat mencegah protein dari proses termal dan agregasi (Ariwulan, 2013).

Klasifikasi bakteri *Aeromonas hydrophila* menurut Buchanan dan Gibbson's *dalam* Pusat Karantina Ikan (1999), Super Kingdom: Bacteria, Phylum: Proteobacteria, Class: Gammapro-

teobacteria, Ordo: Aeromonadales, Family: Aeromonadaceae, Genus: Aeromonas, Species : *Aeromonas hydrophila*.

*Aeromonas hydrophila* telah dihubungkan dengan beberapa penyakit pada ikan, termasuk ekor busuk, sirip busuk, haemorrhagic septicaemia. Haemorrhagic septicaemia ditandai dengan adanya luka pada permukaan, sering mengarah pada pengelupasan sisik, pendarahan pada insang dan dubur, borok, bisul, exophthalmia (mata membesar), pembengkakan perut. Pada bagian dalam dimungkinkan adanya cairan ascetic di dalam rongga, kekurangan darah merah, serta pembengkakan ginjal dan hati (Miyazaki dan Kage, 1985).

Secara khusus bakteri *Aeromonas hydrophila* merupakan ruang lingkup akreditasi laboratorium pemeriksaan Stasiun Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Kelas 1 Pekanbaru (LP-676-IDN). Bakteri ini masih dianggap berbahaya dan dampak serangannya terhadap sumber daya perikanan sangat merugikan. Untuk itu agar tindakan diagnosa di lapangan maupun di laboratorium tidak mengalami kekeliruan, maka kesediaan isolat yang baik dan aman sebagai bahan pembentukan alat diagnosa menjadi suatu kebutuhan dalam pelaksanaan tindak karantina ikan.

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 *et al.*, (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°C) dilakukan agar bakteri menjadi tidak aktif sehingga dapat disimpan dalam waktu lama. Masalahnya adalah kristal es yang dapat merusak sel.

Media TSB mengandung kasein dan pepton kedelai yang menyediakan asam amino dan substansi nitrogen lainnya yang membuatnya menjadi media bernutrisi untuk bermacam mikroorganisme. Dextrosa adalah sumber energi dan natrium klorida mempertahankan kesetimbangan osmotik (Anonim, 2014a). Medium Nutrient Broth merupakan medium yang memiliki kegunaan sebagai medium untuk menumbuhkan bakteri sama seperti medium NA (Anonim, 2014b).

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. Men-suspensikan bakteri tersebut dengan menggunakan jarum ose apabila kultur dilakukan di agar miring, atau spreader steril apabila kultur dilakukan di petridisk. Memasukkan suspensi bakteri tersebut pada cryotube dalam deep freezer (Aritonang, 2006).

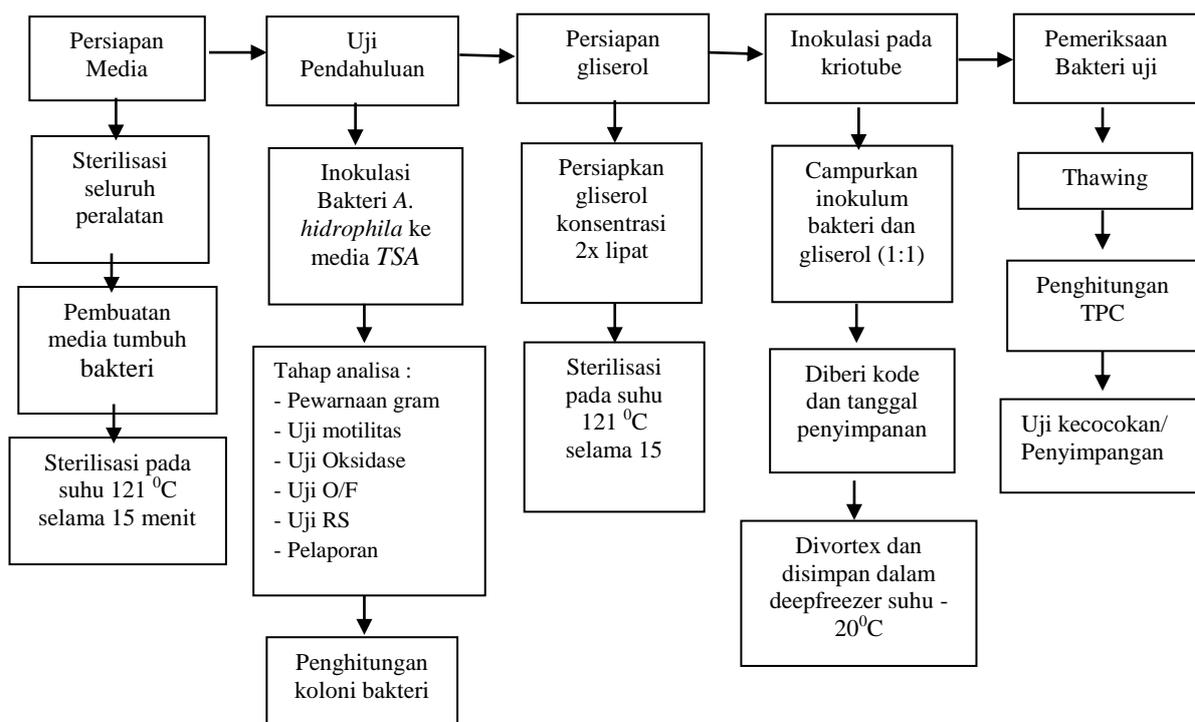
Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi gliserol dalam TSB (Tryptic Soy Broth) yang optimal sebagai media penyimpanan bakteri *Aeromonas hydrophila*. Manfaat dari penelitian ini adalah diperolehnya metode koleksi spesimen isolat bakteri *Aeromonas hydrophila* yang baik dan aman untuk masa datang.

## METODE PENELITIAN

Penelitian penyimpanan bakteri *Aeromonas hydrophila* pada media TSB dengan ditambah gliserol dilakukan 56 hari yaitu bulan Maret sampai April 2014, bertempat di laboratorium Stasiun Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Kelas I Pekanbaru.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metoda eksperimen dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) 1 faktor dan 4 taraf perlakuan, masing-masing perlakuan dengan 3 kali ulangan. Perlakuan penelitian terdiri dari :

- P1 : Media TSB + Gliserol 10%
- P2 : Media TSB + Gliserol 15%
- P3 : Media TSB + Gliserol 20%
- P4 : Media TSB + Gliserol 25%



Gambar 1. Prosedur Penelitian

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk melihat viabilitas (tingkat kelangsungan hidup) *Aeromonas hydrophila* yang disimpan dalam Tryptic Soy Broth yang ditambah dengan gliserol pada kondisi suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ . Konsentrasi gliserol yang digunakan adalah sebesar 10%, 15%, 20%, 25% dan waktu penyimpanan bakteri selama 56 hari. Data yang diamati dalam penelitian ini adalah tumbuhnya bakteri, kepadatan bakteri, viabilitas bakteri dan kecocokan atau penyimpangan bakteri yang disimpan selama 56 hari.

### Pertumbuhan Bakteri *A. hydrophila*

Hasil pengamatan tumbuh dan tidak tumbuhnya bakteri 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 tumbuh pada media Rimmner-shotts Agar pada pengenceran  $10^{-1}$  -  $10^{-10}$ . Data pertumbuhan bakteri menunjukkan

perbedaan dari setiap perlakuan. Perbedaan daya tumbuh bakteri ini dipengaruhi oleh beberapa hal, antara lain; tekanan osmosis bakteri dengan krioprotektan, nutrisi, penurunan suhu dan proses *thawing* (pencairan isi tube). Terjadinya penurunan daya tumbuh bakteri menunjukkan bahwa sebagian dari bakteri yang disimpan tersebut sudah mengalami kematian, sehingga hanya tumbuh sebagian. Bakteri *A. hydrophila* 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 hipotonik maka air cairan krioprotektan akan masuk menembus dinding sel. Masuknya air ke dalam sel karena proses osmosis ini menyebabkan pembengkakan yang menyebabkan pecahnya/ kerusakan membran sel.

Bakteri yang disimpan dengan gliserol 15% dan 20% memiliki pola daya tumbuh yang sama. Pada hari ke-14 dan ke-28 bakteri yang disimpan dengan gliserol pada konsentrasi tersebut mengalami perubahan daya tumbuh sedikit. Hal ini kemungkinan disebabkan keseimbangan antara konsentrasi krioprotektan dengan sitoplasma adalah isotonis. Kondisi ini memungkinkan terjadinya pertukaran antara air

Tabel 1. Data Tumbuh Bakteri *A. hydrophila* Selama 56 Hari Penyimpanan Pada Suhu -20°C

Hari ke-	Parameter	Pengenceran (CFU/ml)			
		Gliserol 10%	Gliserol 15%	Gliserol 20%	Gliserol 25%
1	Tumbuh	10 <sup>-1</sup> -10 <sup>-10</sup>			
14	Tumbuh	10 <sup>-1</sup> -10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-1</sup> -10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-1</sup> -10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-1</sup> -10 <sup>-8</sup>
28	Tumbuh	10 <sup>-1</sup> -10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-1</sup> -10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-1</sup> -10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-1</sup> -10 <sup>-6</sup>
42	Tumbuh	10 <sup>-1</sup> -10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-1</sup> -10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-1</sup> -10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-1</sup> -10 <sup>-3</sup>
56	Tumbuh	10 <sup>-1</sup> -10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-1</sup> -10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-1</sup> -10 <sup>-5</sup>	-

dari sitoplasma dengan gliserol, sehingga air di dalam sel bakteri dapat digantikan oleh gliserol. Oleh sebab itu pada waktu terjadi proses pendinginan tidak terjadi kristalisasi air dalam sel sehingga tidak membengkak dan rusak. Akibatnya daya tumbuh bakteri lebih tinggi.

Ryan *dalam* Simanjuntak *dkk.* (2008), menyatakan gliserol merupakan bahan preservasi yang baik, tetapi dapat menyebabkan masalah yang berkaitan dengan tekanan osmosis. Waluyo (2012), tekanan osmosis menjadi salah satu faktor fisik pengendali mikroorganisme. Sisa air dalam sel yang mengalami kristalisasi inilah yang merusak sel sehingga mengalami kematian. Pada penelitian ini, kemungkinan tekanan osmosis sitoplasma dari bakteri yang disimpan dengan gliserol 10% lebih tinggi dari media lingkungannya, dan sebaliknya bakteri yang disimpan dengan gliserol 25% tekanan osmosis sitoplasmanya lebih rendah dari media lingkungannya.

Turunnya daya tumbuh bakteri ini mungkin juga disebabkan proses pendinginan (pemasukan dalam freezer), biakan bakteri langsung dimasukkan dalam freezer dengan suhu -20°C (penurunan suhu tidak dilakukan secara bertahap), maka proses difusi/ osmosis tidak dapat berjalan dengan sempurna dan akibatnya masih ada sisa air dalam sel. Anonim (1999) menyatakan bahwa proses pembekuan memiliki efek yang dramatis terhadap kelangsungan hidup sel. Adanya kadar air yang terlalu tinggi dalam sel menyebabkan kerusakan sel. Nitimulyo (1994), untuk mencegah kerusakan sel maka perlu dilakukan pendinginan (penurunan suhu) perlahan-lahan sekitar 1°C per menit.

Penyimpanan kultur sel suatu organisme harus dilakukan secara bertahap/ melalui proses adaptasi. Tahapan penurunan suhu yang dianjurkan adalah berkisar antara -1°C sampai dengan -3°C per menit. Hal ini bertujuan untuk mencegah dehidrasi pada sel karena adanya kejutan

suhu. Adanya kejutan suhu pada sel bakteri akan menyebabkan terjadinya proses pembekuan di dalam sel, dimana cairan sitoplasma bakteri yang terdiri dari air membentuk kristal es sehingga bahan penyimpanan dalam gliserol tidak dapat berfungsi untuk melindungi sel dari proses pembekuan secara sempurna (Ryan *dalam* Simanjuntak *dkk.* 2008).

Daya tumbuh bakteri yang disimpan dengan gliserol 25% sudah menurun pada hari ke-14, statis sampai dengan hari ke-42 dan mengalami kematian total pada hari ke-56. Hal ini kemungkinan terjadi karena kandungan nutrisi dalam TSB yang lebih sedikit dibandingkan dengan gliserol 10% dan 15%, serta suhu yang digunakan belum optimal untuk menghentikan metabolisme bakteri secara total. Simanjuntak *dkk.* (2008), menyatakan bahwa suhu yang belum optimal digunakan untuk menghentikan metabolisme secara total maka energi yang ada dalam sel tersebut digunakan untuk melakukan metabolisme. Akibatnya sebagian bakteri kehabisan nutrisi dan akhirnya mati, sehingga bakteri yang mampu tumbuh menjadi berkurang.

Penurunan daya tumbuh ini juga disebabkan pada proses *thawing* biakan bakteri yang langsung dikeluarkan dari deepfreezer dan dibiarkan pada suhu kamar hingga mencair. Ryan *dalam* Simanjuntak *dkk.* (2008), proses *thawing* sebaiknya dilakukan dengan cara merendam tube tempat biakan bakteri dalam air hangat (37°C) selama 60-90 detik sehingga es mencair dengan cepat. Tetapi dalam penelitian ini biakan bakteri hanya dibiarkan pada suhu kamar, sehingga waktu yang diperlukan untuk mencairkan es menjadi lebih lama. Proses pencairan biakan yang relatif lama ini kemungkinan merusak sel sehingga sebagian sel mati dan akibatnya hanya sedikit sel bakteri yang mampu tumbuh pada saat dibiakkan kembali. Pada penelitian ini dapat diketahui bahwa konsentrasi gliserol 15% merupakan konsentrasi yang

Tabel 2. Data Perhitungan Kepadatan Bakteri (*Total Plate Count*)

Hari ke-	Gliserol 10%	Gliserol 15 %	Gliserol 20 %	Gliserol 25 %
0	$5,68 \times 10^{11}$	$5,68 \times 10^{11}$	$5,68 \times 10^{11}$	$5,68 \times 10^{11}$
14	$8,73 \times 10^{10}$	$12,5 \times 10^{10}$	$1,22 \times 10^{10}$	$8,56 \times 10^9$
28	$7,26 \times 10^8$	$5,14 \times 10^9$	$3,12 \times 10^9$	$6,9 \times 10^7$
42	$4,97 \times 10^7$	$3,93 \times 10^8$	$3,44 \times 10^8$	$2,87 \times 10^4$
56	$1,11 \times 10^6$	$2,89 \times 10^7$	$7,53 \times 10^6$	0

paling baik untuk mempertahankan daya tumbuh bakteri dibandingkan konsentrasi gliserol lainnya.

### Kepadatan Bakteri

Kepadatan bakteri dalam penelitian ini dihitung secara tidak langsung. Perhitungan dengan metode jumlah koloni dilakukan untuk mengetahui jumlah bakteri yang hidup saja. Hasil perhitungan kepadatan bakteri yang diperoleh dalam penelitian ini disajikan pada Tabel 2.

Berdasarkan hasil pengamatan terdapat perbedaan kepadatan bakteri pada setiap kali penghitungan. Data di atas menunjukkan adanya penurunan jumlah kepadatan bakteri selama penyimpanan pada media TSB yang ditambah gliserol pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Data ini 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

antara krioprotektan dengan sitoplasma. Pada bakteri yang disimpan dengan gliserol 10% dan 25% proses osmosis tidak dapat 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 15% dan 20%, 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 10% dan 25%.

Dari hasil penelitian ini diketahui bahwa gliserol dengan konsentrasi 15% dan 20% merupakan konsentrasi yang paling efektif untuk menyimpan biakan *A. hydrophila* pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ . Hasil penelitian Simanjuntak *dkk.* (2008) bahwa preservasi bakteri *A. salmonicida* pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  dengan menggunakan gliserol dengan 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. Selanjutnya Hermawan *dkk.* (2008) menyatakan bakteri *Streptococcus* sp dapat bertahan dalam media TSB yang dicampur gliserol 15 - 20% selama 3 bulan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Tabel 3. Viabilitas Bakteri *A. hydrophila* Selama Penyimpanan dalam TSB yang Ditambah Gliserol

Hari ke-	Gliserol 10%	Gliserol 15 %	Gliserol 20 %	Gliserol 25 %
0	100	100	100	100
14	15,35620	12,98768	2,14600	1,50572
28	0,12770	0,90413	0,54881	0,01241
42	0,00874	0,069129	0,06051	0,000005
56	0,00019	0,00508	0,00132	0

Tabel 4. Data Kecocokan atau Penyimpangan Bakteri *A. hydrophilla* Selama 56 Hari Penyimpanan

Uji Biokimia	SNI	T0	T14	T28	T42	T56	Kecocokan
Pewarnaan Gram	-	-	-	-	-	-	Cocok
Uji Motilitas	+	+	+	+	+	+	Cocok
Uji Oksidasi	+	+	+	+	+	+	Cocok
Uji OF	F	F	F	F	F	F	Cocok
Uji RS	+	+	+	+	+	+	Cocok
Persentase Kecocokan dibandingkan SNI		100%	100%	100%	100%	100%	
Peersentase Kecocokan antara T0 dengan hasil penelitian			100%	100%	100%	100%	

### Viabilitas Bakteri

Semakin lama waktu penyimpanan maka presentase viabilitas bakteri semakin menurun. Hal ini berkaitan dengan daya tumbuh bakteri yang dipengaruhi oleh faktor lingkungan terutama suhu dan medianya. Hal ini didukung pendapat Capucino dan Natalie (2001) yang menyatakan bahwa viabilitas (tingkat kelangsungan hidup) bakteri dipengaruhi oleh daya tumbuh bakteri, medium, suhu, pH dan nutrient. Kondisi lingkungan yang tidak optimal untuk pertumbuhan bakteri yaitu suhu rendah ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) menyebabkan sel tidak dapat bekerja untuk melanjutkan kehidupan serta dengan suhu tersebut belum optimal menghentikan proses metabolisme secara total.

Rendahnya viabilitas bakteri yang didapatkan pada penelitian ini dipengaruhi oleh faktor nutrisi, kadar/ konsentrasi bahan preservasi (penyimpanan) dan suhu. Waluyo (2012), menyatakan bahwa sel sangat memerlukan nutrisi untuk mensintesis protoplasma sebagai sumber karbon, sumber nitrogen, metabolit penting (vitamin) dan juga asam amino. Bakteri tumbuh pada lingkungan yang sesuai, apabila lingkungannya tidak optimal maka pertumbuhan bakteri akan berjalan lambat, tidak tumbuh atau bahkan mati.

Viabilitas dari bakteri yang disimpan pada gliserol 15% dan 20% relatif rendah yaitu 0,01015% dan 0,00132%. Murwantoko (2008) menyatakan bahwa tidak ada teknik penyimpanan yang bisa merecovery 100% bakteri yang disimpan. Metode penyimpanan menghasilkan tingkat recovery yang berbeda-beda, tergantung pada spesies bakteri yang disimpan.

Berdasarkan uji statistik yang diterangkan ke dalam bentuk Analisis Variansi didapat F hitung lebih besar dari F tabel dengan tingkat kepercayaan 99%. Hasil uji statistik diketahui

bahwa terdapat perbedaan yang sangat nyata pada viabilitas bakteri *Aeromonas hydrophila* yang disimpan dengan berbagai konsentrasi gliserol dalam TSB pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$

Konsentrasi yang paling baik untuk menyimpan Bakteri *Aeromonas hydrophila* pada penelitian adalah konsentrasi 15%. Hollander dan Nell dalam Howard (1959) menyatakan bahwa keberadaan gliserol 15% mampu melindungi *Eschericia coli*, *Diplococcus pneumonia* dan *Treppemonema yang polidium* dari kerusakan pada pembekuan suhu  $-70^{\circ}\text{C}$  selama 2 bulan penyimpanan tanpa kehilangan virulensi. Selanjutnya bakteri *Aerobacter aerogenes*, *Corynobacterium difteriae*, *Corynobacterium xerose*, *Corynobacterium pseudodipteriticum*, *Diplococcus pneumonia*, *Eschericiacoli*, *Micrococcus pyogene var. aureus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonasaeruginosa*, *Salmonella enteridis*, *Seratia marcenscens*, *Shigela flexneri* dan *Streptococcus viridians* dikultur dengan gliserol 15% yang disuspensikan dalam albini brucela broth yang disimpan pada suhu  $-10^{\circ}\text{C}$  menunjukkan viabilitas selama 5 bulan. Aritonang (2006) menyatakan bahwa Balai Uji Standar Karantina Ikan telah menggunakan gliserol 15% sebagai bahan penyimpanan untuk semua koleksi bakteri pada suhu  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### Kecocokan atau Penyimpangan Bakteri

Berdasarkan hasil pemeriksaan / uji biokimia yang mengacu pada uji SNI (Standar Nasional Indonesia 7303: 2009), diperoleh data kecocokan. Isolat yang diterima pertama kali di uji biokimia sebanyak 3 kali ulangan. Selanjutnya dari uji tersebut dikultur pada media TSB yang kemudian diberi perlakuan. Untuk lebih jelasnya, perbandingan dan data ketidakcocokan tersebut ditabulasikan dalam bentuk Tabel 4.

Kecocokan antara isolat bakteri dari ATCC dengan SNI (2009) adalah sebesar 100% dan kecocokan bakteri indukan dengan bakteri yang disimpan dengan gliserol 10%, 15%, 20%, 25% selama 56 hari adalah 100%. Dari semua uji karakteristik yang dilakukan untuk waktu yang berbeda yakni hari ke 14, 28, 42 dan 56 tidak ditemukan perbedaan uji karakteristik. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa penyimpanan bakteri dengan konsentrasi gliserol yang berbeda pada kondisi suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  tidak mengubah karakteristik bakteri. Hal ini menunjukkan bahwa daya virulensi dari bakteri tersebut masih tetap atau tidak berubah.

Uji biokimia terhadap bakteri menunjukkan gram negatif. Pada saat pewarnaan gram, bakteri kehilangan zat pewarna kristal violet setelah dicuci dengan alkohol dan sewaktu diberi zat warna safranin akan tampak berwarna merah. Selanjutnya, uji motilitas dilakukan untuk melihat pergerakan bakteri yang disimpan dan hasilnya adalah motil atau pergerakannya aktif. Uji ini dilakukan dengan media uji MIO agar. Pada uji MIO terlihat bahwa bakteri tumbuh menyebar.

Uji OF (oksidasi-fermentasi) bertujuan untuk mengetahui sifat oksidasi dan fermentasi terhadap glukosa. Pada penelitian ini ditemukan bahwa bakteri yang disimpan merupakan bakteri yang mampu memfermentasi gula, hal ini ditunjukkan dengan hasil pengamatan bahwa kedua media yang diinokulasi berubah menjadi warna kuning. Uji ini sesuai dengan pendapat Cowwan dan Steel's (1993) dan SNI (2009) yang menyatakan bahwa uji motilitas untuk bakteri *A. hydrophila* adalah positif dan merupakan bakteri yang fermentatif.

Pada uji Rimmmer-shots, bakteri yang diinokulasikan pada media RS Agar adalah positif *A. hydrophila*. Hal ini ditunjukkan dengan bakteri yang tumbuh pada RS medium agar membentuk koloni bulat berwarna kuning. Dari keseluruhan hasil uji yang dilakukan bahwa persentase kecocokan bakteri terhadap uji SNI adalah sebesar 100% dan terhadap indukan (T0) adalah 100%. Bakteri yang disimpan pada penelitian ini tidak mengalami mutasi.

## KESIMPULAN

Daya tumbuh dan persentase viabilitas bakteri *A. hydrophila* yang tertinggi dijumpai

pada bakteri yang disimpan pada gliserol konsentrasi 15%. Penyimpanan bakteri *A. hydrophila* dengan menggunakan gliserol konsentrasi 10%, 15%, 20% dan 25% pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  selama 56 hari tidak menyebabkan terjadinya mutasi dan tidak mengubah karakteristik bakteri. Persentase kecocokan bakteri terhadap indukan adalah sebesar 100%.

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, disarankan melakukan penelitian preservasi (penyimpanan) bakteri dengan konsentrasi yang sama menggunakan suhu yang lebih rendah ( $-70$ ) sehingga diharapkan dapat menyimpan bakteri dalam jangka waktu yang lebih lama.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 1999. Petunjuk Teknis. Teknik Pengembangbiakan dan Penyimpanan Specimen HPI/HPIK (Parasit, Mikotik, Bakteri dan Virus). Pusat Karantina Pertanian, Jakarta.
- Anonim. 2014a. Media Pertumbuhan Mikroba. [www.asalkamutahuaja.blogspot.com](http://www.asalkamutahuaja.blogspot.com). Diakses tanggal 20 Pebruari 2014.
- Anonim. 2014b. Komposisi Nutrien Agar dan Nutrien Broth. [www.dianaph.blogspot.com](http://www.dianaph.blogspot.com). Diakses tanggal 16 Januari 2014.
- Ariwulan, DR. 2013. Metode Penyimpanan Mikroba. [http://nightray13-kuro.blogspot.com/2013/01/boiteknologi\\_review\\_tugas\\_2.html](http://nightray13-kuro.blogspot.com/2013/01/boiteknologi_review_tugas_2.html). Diakses tanggal 4 Nopember 2013.
- Aritonang, A. H. 2006. Penyakit Bakterial pada Ikan, Teknis Pembuatan dan Pemeliharaan Koleksi HPIK Golongan Bakteri. Balai Uji Standar Karantina Ikan, Jakarta.
- Badjoeri, M. 2010. Preservasi Mikroba untuk Pelestarian dan Stabilitas Plasma Nutrifah. *Warta Limnologi* no.45 / tahun xiii, Desember 2010.
- Cappucino, James G and S. Natalie. 2001. *Microbiology Laboratory Manual*. Sixth edition. Benjamin Cummings. San Fransisco.
- Cowwan and Steel's. 1993. *Manual For Identification of Medical Bacteria*. 3<sup>rd</sup> ed. Cambrigge University press. England.
- Herdis, Kusuma I., M. Surachman, R. E. .2003. Optimalisasi Kualitas Semen Beku Domba Garut dengan Pemberian Glyse-

- rol. Prosiding Seminar Teknologi untuk Negeri, Vol II. Bogor.
- Hermawan, T., A. Syarif, M.H. Arisandi, M.D. Saptono, N. Destiana dan M. Atmomarsono. 2008. Viabilitas *Stertococcus* sp Menggunakan Konsentrasi Gliserol Yang Berbeda dalam TSB Selama Empat Bulan Preservasi Beku. Prosiding Hasil Uji Coba Preservasi Vol 3. Pusat Karantina Ikan. Jakarta.
- Holander, D.H and E.E. Nell. 1954. Improved Preservation of *Treponema pallidum* and Other Bacteria by Freezing with Glycerol. *Appl Microbiol*, 2(3): 164-170.
- Howard, D. H. 1959. The Preservation of Bacteria by Freezing in Glycerol Broth. *J. Bacteriol.* 71:625.
- Miyazaki, T. and N. Kaige. 1985. A Histopathological Study on Motile Aeromonad Disease in Crucian Carp. *Fish Pathology*. [www.jstage.jst.go.jp/3/pdf](http://www.jstage.jst.go.jp/3/pdf). Diakses tanggal 6 September 2013.
- Murwantoko. 2008. Preservasi Bakteri. Pelatihan Metode Standar Pemeriksaan HPIK. 21-26 April 2008. Yogyakarta.
- Nitimulyo, K. H. 1994. Determinasi Bakteri Patogenik Penyebab Penyakit Ikan. Jurusan Perikanan, Fakultas Pertanian, Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.
- Noviana, L dan B. Raharjo. 2009. Viabilitas Rhizobakteri *Bacillus* sp. DUCC-BR-K1.3 pada Media Pembawa Tanah Gambut. Disubstitusi dengan Padatan Limbah Cair Industri Rokok. *BIOMA*, 2(1): 30-39.
- Simanjuntak R., S. Baddu, T.S. Ekawati, M Widantari, M.M As'adi. 2008. Preservasi Beku *Aeromonas salmonicida* dengan Gliserol Dalam TSB Selama 6 Bulan. Prosiding Hasil Uji Coba Preservasi, Vol 3. Pusat Karantina Ikan, Jakarta.
- Waluyo, L. 2012. Mikrobiologi Umum. UMM Press. Malang.
- Yuasa, K., N. Panigoro, M. Bahnan, dan E. B. Kholidin. 2003. Panduan Diagnosa penyakit Ikan. Teknik Diagnosa Penyakit Ikan Budidaya Air Tawar di Indonesia. BBAT Jambi dan JICA, Jambi.

