

### **BAB III**

#### **METODE PENELITIAN**

##### **A. Jenis Penelitian**

Jenis penelitian yang akan dilakukan terbagi ke dalam dua jenis penelitian yaitu penelitian deksriptif untuk deteksi gen virulen dan penelitian eksperimental untuk penentuan patogenisitas 96 jam pada ikan gurami (*Osphronemus gouramy*).

##### **B. Populasi dan Sampel**

1. Populasi yang digunakan adalah bakteri *A. hydrophila* yang diisolasi dari air kolam ikan gurami di Pelabuhan Dua Sukabumi, Jawa Barat.
2. Sampel yang digunakan adalah bakteri *A. hydrophila* isolat AKS.

##### **C. Waktu dan Lokasi Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Genetika Jurusan Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia pada bulan Februari sampai bulan Agustus 2012.

##### **D. Alat dan Bahan**

Pada penelitian ini digunakan beberapa alat dan bahan yang digunakan. Daftar alat dan bahan dapat dilihat pada lampiran 2.

## **E. Prosedur Penelitian**

### **1. Sterilisasi Alat dan Bahan**

Pembuatan medium sebagai media tumbuh bakteri *A. hydrophila*. Medium yang digunakan adalah medium TSA (Tripicase Soy Agar). Botol duran yang digunakan untuk menyimpan larutan terlebih dahulu dicuci dan dibilas dengan deion dan dikeringkan. Botol tersebut dibungkus dengan kertas pembungkus, selanjutnya dibungkus lagi dengan plastik anti panas, setelah itu dilakukan sterilisasi dengan cara di masukan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit dan tekanan 15 lb.

### **2. Isolasi Bakteri dari Air Kolam**

Air kolam diambil dengan menggunakan botol steril. air kolam di encerkan dengan akuades steril secara pengenceran serial menjadi 1x, 10x dan 100x . Satu ml dari hasil pengenceran diambil kemudian di campur dengan sembilan ml medium agar Rimler-Shotts + antibiotik novobiosin sebagai penghambat bakteri yang lain. Kemudian kultur di inkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam. Koloni bakteri yang berwarna kuning diisolasi dan dilakukan purifikasi kembali dalam medium Rimler-Shotts + antibiotik novobiosin. Hasil purifikasi, diambil 1 koloni secara acak yang selanjutnya dilakukan identifikasi menurut Standar Nasional Indonesia (2009)

### **3. Identifikasi Bakteri Isolat AKS**

Identifikasi bakteri isolat air kolam Sukabumi dilakukan secara Biokimia (SNI, 2009) dan biologi molekuler. Identifikasi bakteri *A. hydrophila* secara morfologi dan biokimia mengacu pada pedoman SNI (2009). Sedangkan

Identifikasi bakteri *A. hydrophila* secara molekular menggunakan primer spesifik *A. hydrophila* yang mengacu pada Gardenia (2010) dan Nielsen *et al.*, (2001).

#### **a. Identifikasi secara Biokimia**

##### **1) Uji Rimler-Shotts**

Dengan menggunakan jarum *ose*, bakteri diinokulasikan ke dalam media agar Rimler-Shotts + antibiotik novobiosin, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Penampakan koloni dilihat dengan hasil positif menunjukkan berwarna kuning tanpa warna hitam di tengah koloni.

##### **2) Motilitas**

Isolat diambil dengan jarum *ose* lurus, kemudian diinokulasikan dengan menusukkan pada media semi solid (SIM agar). Lalu diinkubasi pada suhu 28°C selama 18-24 jam. Bakteri yang bersifat positif motil menunjukkan pergerakan bakteri pada medium yang ditandai dengan penyebaran bakteri di daerah tusukan. Sedangkan bakteri yang negatif motil, hanya tumbuh pada daerah tusukan.

##### **3) Uji Oksidasi**

Uji oksidasi dilakukan dengan menumbuhkan bakteri pada medium TSA dan proses inkubasi dilakukan pada suhu 28°C selama 24 jam. Setelah itu, diambil satu loop isolat bakteri, kemudian digoreskan pada kertas saring yang sudah dibasahi pereaksi oksidasi. Reaksi oksidasi positif ditandai dengan munculnya warna biru keunguan pada goresan.

##### **4) Pewarnaan Gram**

Gelas objek dibersihkan dari lemak dengan alkohol 70% kemudian diberi label. Selanjutnya pada permukaan gelas objek tersebut, diteteskan akudes steril.

Kemudian, isolat bakteri yang diuji diambil dengan jarum *ose* steril, selanjutnya dicampur dengan akuades dengan cara diulas merata pada permukaan gelas objek. Setelah itu, preparat bakteri difikasasi panas dengan melewati preparat di atas api (jarak 15 cm) sebanyak 3 kali, kemudian tunggu sampai kering. Preparat bakteri yang sudah kering ditetesi dengan kristal violet secara merata selanjutnya didiamkan selama satu menit, lalu dicuci dengan akuades mengalir. Setelah itu, preparat ditetesi larutan iodine-lugol sampai merata kemudian didiamkan selama satu menit. Selanjutnya, preparat dicuci dengan cara dimasukkan ke dalam *stanning jar* yang berisi alkohol 96%, lalu didiamkan sambil goyang pelan selama 30 detik. Kemudian preparat dicuci dengan akuades lalu dikeringanginkan. Selanjutnya, preparat ditetaskan 5 tetes dengan larutan safranin sampai merata dan didiamkan selama dua menit. Kemudian, di cuci kembali dengan akuades lalu dikering anginkan. Preparat siap diamati dibawah mikroskop.

##### 5) Uji Oksidatif-Fermentatif

Sebanyak 2 tabung berisi media oksidatif-fermentatif diinokulasikan bakteri yang diuji, dengan cara ditusukkan menggunakan jarum *ose* lurus. Satu tabung diisi dengan paraffin cair steril hingga ketinggian 1 cm diatas permukaan media media oksidatif-fermentatif , sedangkan tabung lainnya tanpa paraffin cair. Hasil interpretasi uji oksidatif-fermentatif dapat dilihat dari tabel 2.2.

## **b. Identifikasi secara Biologi Molekuler (Gardenia, 2010 & Nielsen, 2001)**

### **1) Isolasi DNA**

Sampel bakteri diinokulasikan pada medium TSA, kemudian di inkubasi pada suhu 28° C selama 24 jam. Keesokan harinya, bakteri yang telah tumbuh pada media TSA dipindahkan ke media cair (TSB) dengan cara sebanyak satu *ose* kultur padat di inokulasikan ke dalam medium TSB, lalu diinkubasi selama 14 jam pada suhu 28° C.

Sebanyak 1,5 ml kultur cair dimasukkan ke tabung ependorf baru dan steril, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 5.000 rpm selama dua menit. Supernatan pada tabung ependorf dibuang, dan pada pelet yang terbentuk ditambahkan 500 µl buffer TE pH 8,0 dan 100 µl SDS 10 %, dihomogenkan dengan cara dibolak-balik pelan sebanyak 50 kali. Hal ini dimaksudkan untuk mendenaturasi protein sehingga membran sel akan mengalami lisis. Setelah homogen kemudian tabung isolasi DNA ditambahkan 10 µl proteinase-K (10 mg/ml) selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama satu jam. Selama proses inkubasi, tabung dibolak-balik tiga kali setiap 15 menit sekali. Setelah itu, tabung tersebut ditambahkan larutan NaCl 5 M sebanyak 100 µl, lalu ditambah 100 µl buffer lisis CTAB, dimana buffer lisis CTAB yang digunakan dipanaskan terlebih dahulu pada suhu 65°C selama lima menit. Penambahan buffer lisis CTAB ini, tujuannya untuk menghancurkan makromolekul dalam sel. Setelah penambahan buffer lisis CTAB, tabung tersebut diinkubasi pada suhu 65°C selama 20 menit. Selanjutnya, tabung ditambahkan 500 µl (CIAA) chloroform:isoamil alkohol (24:1). Setelah itu tabung tersebut dibolak-balikan sebanyak 50 kali. Penambahan CIAA untuk membantu



proses denaturasi protein, selain itu CIAA ini juga berfungsi sebagai antibiuh ketika dikocok. Selanjutnya, tabung isolasi DNA disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama lima menit. Setelah proses sentrifugasi larutan dalam tabung tersebut terbagi menjadi tiga fasa. Bagian fasa teratas diambil dimasukkan ke dalam tabung ependorf yang baru dan steril. Kemudian larutan dalam tabung baru, ditambahkan 20 µl RNase, kemudian diinkubasi selama satu jam. Setiap 15 menit sekali tabung isolasi DNA di bolak-balik sebanyak tiga kali. Setelah itu, tabung isolasi DNA ditambahkan kembali larutan 500 µl CIAA (Chloroform:Isoamil alkohol) (24:1) lalu dibolak-balik sebanyak 50 kali. Setelah itu, tabung tersebut disentrifugasi kembali pada kecepatan 13.000 rpm selama lima menit. Dari proses tersebut, larutan dalam tabung isolasi DNA terbagi menjadi tiga fasa kembali. Kemudian dari fasa cair bagian atas (supernatan) tersebut diambil dengan ujung tips yang steril, lalu dipindahkan pada tabung ependorf yang baru dan steril. Setelah itu, larutan yang telah dipindahkan tabung ependorf yang baru ditambahkan etanol absolut dingin sebanyak 2x volume fasa cair. Setelah itu, dikocok cepat dan disimpan pada suhu -20°C selama 20 menit untuk melepas molekul air. Setelah proses pendinginan kemudian larutan disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama lima menit. Selanjutnya bagian fasa cair (supernatant) dibuang sehingga yang tersisa hanya pelet DNA. Pelet ini kemudian ditambahkan satu ml Ethanol 70% dingin, lalu disentrifugasi pada 13.000 rpm selama lima menit. Setelah sentrifugasi bagian fasa cair dalam larutan (supernatant) dibuang sampai yang tersisa hanya pelet DNA. Kemudian pelet DNA, dikeringkan untuk menguapkan sisa-sisa etanol. Setelah itu, pelet DNA

ditambahkan 20 µl buffer TE steril untuk melarutkan DNA. Untuk mempermudah DNA larut pada buffer TE, dilakukan proses inkubasi pada suhu 37° C selama lima menit. Selanjutnya, DNA disimpan pada suhu -20°C.

## 2) Mengukur Konsentrasi DNA

Sebelum dilakukan proses amplifikasi, sampel DNA yang telah diisolasi selanjutnya diukur konsentrasi DNANYa dengan menggunakan alat spektrofotometer dengan panjang gelombang  $A_{260}$  dan  $A_{280}$ . Setelah diketahui konsentrasi DNA yang terkandung dalam sampel DNA, selanjutnya sampel ditetapkan dengan konsentrasi 50 ng/µl. Konsentrasi DNA yang terkandung dapat diketahui dengan rumus:

$$\text{Konsentrasi DNA (ng/}\mu\text{l)} = \text{Nilai } A_{260} \times \text{Konstanta DNA (50)} \times \text{faktor pengenceran}$$

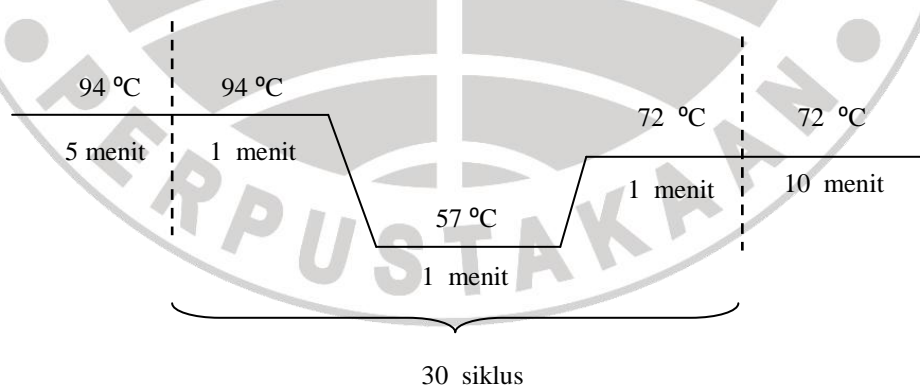
## 3) Amplifikasi Gen Spesifik *A. hydrophila*

Identifikasi *A. hydrophila* secara molekular dapat dilakukan dengan teknik PCR menggunakan primer spesifik untuk *A. hydrophila*. Proses Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan *thermocycler* merk Eppendorf dengan program suhu PCR menurut Gardenia (2010) yang telah dimodifikasi. Komposisi PCR yang digunakan adalah ½ reaksi menurut protokol merek *Master Mix KAPPA 2G<sup>TM</sup> Fast ReadyMix (2X)* dari Produsen Genetika Scientific. Komposisi reaksi amplifikasi dalam penelitian ini dapat dilihat tabel 3.1.

Tabel 3.1 Komposisi Reaksi Amplifikasi Gen Spesifik *A. hydrophila*

Bahan	Konsentrasi awal	Konsentrasi akhir	Volume reaksi (μl)
2X kappa2G Fast ReadyMix	2 X	1 X	6,25
Primer <i>Forward spAH</i>	10 mM	0,5 mM	0,625
Primer <i>Reverse sp AH</i>	10 mM	0,5 mM	0,625
Air Deion steril	-	-	4
DNA templete	50 ng/μl	50 ng	1
Total Volume			12,5

Proses amplifikasi diawali dengan tahap denaturasi awal pada suhu 95° C selama 5 menit, kemudian diikuti dengan 30 kali siklus yang berlangsung dengan tahap denaturasi pada suhu 94°C selama satu menit, *annealing* pada suhu 57°C selama satu menit, *elongasi* pada suhu 72°C selama satu menit dan diakhiri dengan *final elongasi* pada 72°C selama 10 menit. Program PCR dapat dilihat pada gambar 3.2. Hasil amplifikasi akan disimpan pada suhu -20°C.

Gambar 3.1 Program Suhu PCR yang Digunakan dalam Proses Amplifikasi Gen Spesifik *A. hydrophila*



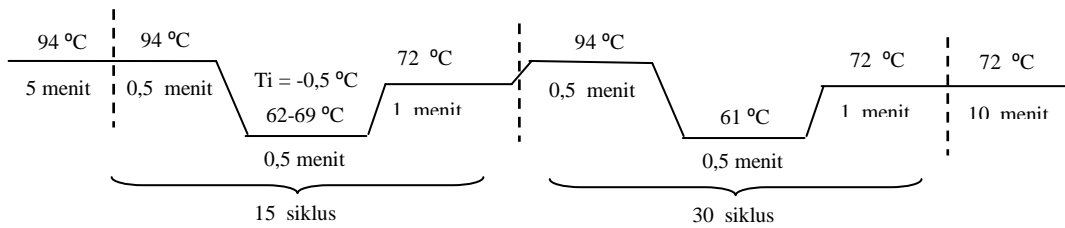
#### 4. Deteksi Gen Virulen

Deteksi gen virulen dilakukan dengan proses Amplifikasi dengan teknik PCR. Komposisi PCR yang digunakan adalah  $\frac{1}{2}$  reaksi menurut protokol *Master Mix* KAPPA 2G<sup>TM</sup> Fast ReadyMix (2X). Komposisi reaksi amplifikasi dalam penelitian ini dapat dilihat tabel 3.2.

Tabel 3.2 Komposisi Reaksi Amplifikasi Gen Virulen *A. hydrophila*

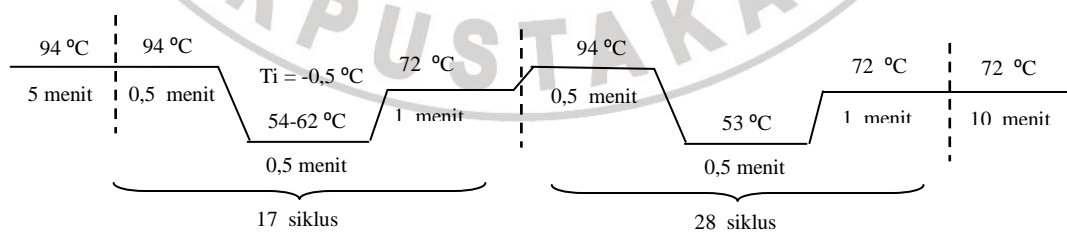
Bahan	Konsentrasi awal	Konstrasi akhir	Volume reaksi (µl)
2X kappa2G Fast ReadyMix	2 X	1 X	6,25
Primer <i>Forward</i>	10 mM	0,5 mM	0,625
Primer <i>Reverse</i>	10 mM	0,5 mM	0,625
Air Deion steril	-	-	4
DNA template	50 µg/µl	50 µg	1
Total Volume			12,5

Proses Amplifikasi gen virulen dilakukan dengan metode *Touch-Down* PCR. Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan empat primer yaitu *aerA*, *alt*, *ast*, dan *act*. Untuk primer *alt*, *ast*, dan *act* proses amplifikasi diawali dengan proses denaturasi awal pada suhu 94°C selama 5 menit diikuti dengan 15 siklus berlangsung dengan tahap denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 69-62°C dengan *temperature increment* -0,5°C, *elongasi* pada suhu 72°C selama 1 menit. Selanjutnya diikuti dengan 30 siklus yang diawali dengan proses denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 61°C, *elongasi* pada suhu 72°C selama 1 menit. Kemudian, diakhiri dengan *final elongasi* pada suhu 72°C selama 10 menit. Program PCR dapat dilihat pada gambar 3.2.



Gambar 3.2 Program Suhu PCR pada Proses Amplifikasi Gen *act*, *alt*, dan *ast*

Sedangkan Primer *AerA* menggunakan program suhu PCR diawali dengan proses denaturasi awal pada suhu 94°C selama 5 menit diikuti dengan 17 siklus berlangsung dengan tahap denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 62-54°C dengan *temperature increment* -0,5°C, *elongasi* pada suhu 72°C selama 1 menit. Selanjutnya diikuti dengan 28 siklus yang diawali dengan proses denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 53°C, *elongasi* pada suhu 72°C selama 1 menit. Kemudian, diakhiri dengan *final elongasi* pada suhu 72°C selama 10 menit. Program PCR dapat dilihat pada gambar 3.3. Hasil amplifikasi disimpan pada suhu -20°C.



Gambar 3.3 Program Suhu PCR pada Proses Amplifikasi Gen *aerA*

## 5. Elektroforesis Hasil PCR Gen Spesifik dan Gen Virulen *A. hydrophila*

DNA yang telah diperbanyak melalui proses amplifikasi selanjutnya dielektroforesis untuk melihat larik DNA yang telah teramplifikasi. Elektroforesis ini dilakukan pada gel agarose 2% dalam 0,5x TBE. Sampel yang dimasukkan ke dalam sumur sebanyak 3,5 $\mu$ l. Namun, sebelum dimasukkan ke dalam sumur gel, DNA sampel dicampurkan dengan “loading dye” dengan perbandingan DNA : loading dye adalah 5:2(v/v). DNA marker yang digunakan adalah 1,5  $\mu$ l DNA ladder 100 bp. Campuran tersebut dielektroforesis selama 40 menit dengan tegangan 100 volt.

Pewarnaan gen agarosa dilakukan dengan merendam gel dalam larutan ethidium bromide selama 3 menit. Kemudian gel agarosa dicuci dengan air deion steril selama 5 menit. Selanjutnya gel diamati dengan alat UV transilluminator dan gel didokumentasikan dengan kamera *Canon* tipe A495.

## 6. Cryoreservasi

Bakteri *A. hydrophila* Isolat AKS dimasukkan ke dalam Crayo buffer. Satu loop inokulasi penuh berisi isolat bakteri, dimasukkan ke dalam tabung Ependorf yang berisikan 600  $\mu$ l Crayo buffer, kemudian disimpan pada suhu -20 $^{\circ}$ .

## 7. Pembuatan Kurva Tumbuh dan Kurva Baku Bakteri *A. hydrophila* Isolat AKS

### a. Kurva Tumbuh Bakteri *A. hydrophila* Isolat AKS

Bakteri uji diaktivasi terlebih dahulu dengan menginokulasikan satu ose bakteri yang diambil dari biakan murni, ke dalam labu erlenmeyer yang berisi 10

ml medium TSB (*Tripic Soy Broth*) lalu di inkubasi pada *waterbath shaker* dengan kecepatan 120 rpm dengan suhu 28°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, biakan bakteri dimasukan ke dalam labu erlenmeyer yang berisi 90 ml medium TSB kemudian diinkubasi lagi dengan kecepatan 120 rpm pada suhu 28°C selama 25 jam. Metode yang digunakan untuk membuat kurva tumbuh ini dinamakan metode turbidimetri. Setiap dua jam, diambil sebanyak 0,5 ml dari labu kultur, lalu dimasukkan ke dalam *cuvete*. Kemudian nilai absorbansi dihitung menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Kurva tumbuh dibuat berdasarkan hasil hubungan nilai absorbansi (sumbu Y) dengan waktu (sumbu X). Dari kurva tumbuh ini dapat diketahui umur biakan pada saat mencapai fase log. Pada fase log inilah ditentukan laju pertumbuhan *A. hydrophila* sehingga umur inokulum yang paling baik dapat ditentukan (Cappuccino & Sherman 2005)

**b. Penentuan Umur Inokulum Bakteri *A. hydrophila* Isolat AKS**

Proses penentuan umur inokulum berdasarkan laju pertumbuhan spesifik bakteri yang tertinggi pada fase log. Pada penelitian ini, penentuan umur inokulum dilakukan dari umur 0 sampai 11 jam. Prosesnya diawali dengan aktivasi bakteri pada medium TSB sebanyak 10 ml. Kemudian kultur diinkubasi pada *waterbath shaker* dengan kecepatan 120 rpm pada suhu 28°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, biakan 10 ml bakteri tersebut kemudian dimasukan ke dalam labu erlenmeyer lain yang berisi 90 ml medium TSB lalu diinkubasi lagi dengan kecepatan 120 rpm dengan suhu 28°C selama 11 jam. Setiap dua jam, diambil

sebanyak 0,5 ml dari labu kultur, lalu dimasukkan ke dalam *cuvete*. Kemudian nilai absorbansi dihitung menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Bersamaan dengan itu, diambil satu ml biakan ke dalam tabung reaksi yang berisi sembilan ml akuades steril untuk pengenceran  $10^{-1}$  lalu dihomogenkan dengan *vortex*. Dari tabung pengenceran  $10^{-1}$  kemudian diambil lagi sebanyak satu ml dan dimasukkan ke dalam sembilan ml aquades steril lain untuk pengenceran  $10^{-2}$ , begitu seterusnya hingga pengenceran  $10^{-8}$ . Pada pengenceran  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ , dan  $10^{-6}$  diambil satu ml biakan, lalu dimasukkan ke dalam cawan petri steril kemudian dicampurkan dengan sembilan ml medium TSA (*Triplic Soy Agar*). Biakan bakteri dalam cawan petri diinkubasi pada suhu  $28^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam. Jumlah koloni bakteri uji yang tumbuh dihitung dengan menggunakan *colony counter*. Jumlah Koloni yang terbentuk setara dengan jumlah sel bakteri (CFU/ml) x faktor pengenceran (Cappucino & Sherman, 2005). Dari hasil tersebut, di cari laju pertumbuhan spesifik Nilai laju pertumbuhan yang paling tinggi dijadikan umur inokulum dalam penyuntikkan (Meita & Kurniade, 2005).

$$\mu = \frac{\log A_x - \log A_o}{0,301 \cdot \Delta t}$$

$\mu$  = laju pertumbuhan spesifik

$A_x$  = jumlah populasi bakteri setelah waktu t

$A_o$  = jumlah populasi awal bakteri

$\Delta t$  = selang waktu anatar pengukuran jumlah bakteri populasi awa bakteri

( $A_o$ ) dan populasi setelah waktu tertentu ( $A_x$ )



**c. Kurva Baku Bakteri *A. hydrophila* Isolat AKS**

Proses aktivasi, dilakukan dengan menumbuhkan bakteri dalam medium 10ml TSB lalu di inkubasi pada *Waterbath Shaker* pada suhu 28°C selama 24 jam dengan kecepatan 120 rpm. Setelah 24 jam, biakan bakteri kemudian dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer yang berisi 90 ml medium TSB kemudian diinkubasi lagi pada suhu 28°C selama 5 jam dengan kecepatan 120 rpm. Selanjutnya, biakan disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm 3 menit. Setelah itu dilakukan pencucian dengan NaCl 0,85 %. Selanjutnya, pelet bakteri dilarutkan dalam 5 ml NaCl 0,85 %. Kemudian larutan pelet bakteri di encerkan 50x, 100x, 150x, 200x, dan 250x. Selanjutnya diperiksa tingkat kekeruhannya dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm. Selanjutnya untuk melihat jumlah bakteri di buat pengenceran serial sampai  $10^{-9}$  dengan cara satu ml biakan yang telah diperiksa tingkat kekeruhannya dimasukkan ke dalam sembilan ml aquades steril untuk pengenceran  $10^{-1}$  lalu dihomogenkan dengan *vortex*. Dari tabung pengenceran  $10^{-1}$  kemudian diambil lagi sebanyak satu ml dan dimasukkan ke dalam sembilan ml aquades steril lain untuk pengenceran  $10^{-2}$ , begitu seterusnya hingga pengenceran  $10^{-9}$ . Pada pengenceran  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ , dan  $10^{-7}$  diambil satu ml biakan, lalu dimasukkan ke dalam cawan petri steril kemudian dicampurkan dengan sembilan ml medium TSA (*Tripic Soy Agar*). Biakan bakteri dalam cawan petri diinkubasi pada suhu 28°C selama 24 jam. Jumlah koloni bakteri uji yang tumbuh dihitung dengan menggunakan *colony counter*. Jumlah Koloni yang terbentuk setara dengan jumlah sel bakteri (CFU/ml) x faktor pengenceran (Cappucino & Sherman, 2005).

Kurva baku dibuat berdasarkan korelasi nilai absorbansi (sumbu X) dengan jumlah bakteri (sumbu Y). Kurva baku dibuat dengan program *Microsoft Excel*, kemudian dibuat persamaan korelasi antara nilai absorbansi pada sumbu X dengan jumlah bakteri sumbu Y.

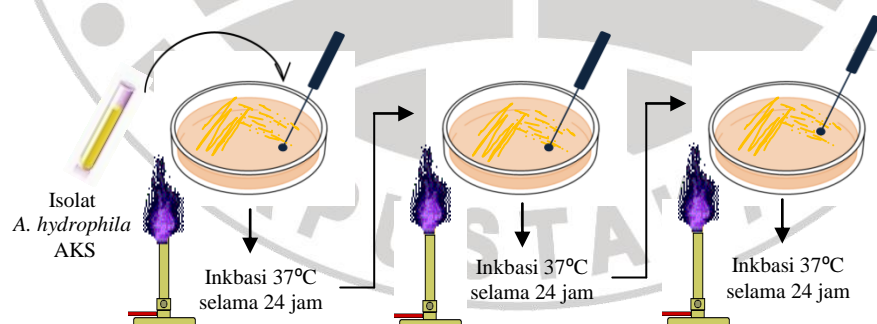
#### **8. Aklimasi Ikan Gurami (*Osphronemus gouramy*)**

Aklimasi ikan gurami (*Osphronemus gouramy*) perlu dilakukan sebagai penyesuaian diri ikan dalam keadaan laboratorium. Proses aklimasi dilakukan dengan memelihara ikan gurami dalam akurarium pemeliharaan yang berukuran 40x20x50 (P x L x T) berisi air sumur. Air sumur yang digunakan dipastikan terlebih dahulu tidak mengandung bakteri *A. hydrophila*. Proses pemastian air sumur bebas dari bakteri *A. hydrophila* dilakukan dengan cara satu ml air sumur dimasukan ke dalam cawan petri steril, kemudian ditambahkan sembilan ml medium Rimler-Schoot + antibiotik novobiosin, setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Jika tidak ada koloni bakteri yang muncul, maka air sumur dapat digunakan untuk pemeliharaan ikan gurami. Proses pemeliharaan dengan air sumur dilakukan selama ± tiga hari. Setelah itu, digantikan dengan menggunakan air ledeng. Seperti air sumur, air ledeng juga dipastikan terlebih dahulu tidak mengandung bakteri *A. hydrophila*. Selama proses aklimasi pemberian ikan dilakukan dua kali sehari sebanyak 7,5 g untuk 50 ekor ikan. Proses aklimasi juga dilengkapi filter dan aerasi. Sementara itu, suhu air ditetapkan pada suhu 28°C menggunakan penghangat air. Proses aklimasi dengan air ledeng dilakukan selama 14 hari.

Sementara itu, akuarium yang digunakan untuk perlakuan dengan ukuran 20 x 20 x 50 (P x L x T) didesinfektan terlebih dahulu dengan larutan Kalium permanganate ( $\text{KMnO}_4$ ) 2,5 mg/L selama 24 jam (Yusa, *et al.*, 2003). Setelah itu, akuarium tersebut dibilas menggunakan air ledeng. Selanjutnya, akuarium tersebut di jemur di bawah sinar matahari sampai kering. Akuarium yang sudah kering, baru bisa digunakan untuk perlakuan ikan. Namun, sebelum proses penyuntikkan, ikan dipelihara terlebih dahulu dalam akuarium perlakuan selama 4 hari.

#### 9. Deteksi Hemolisis dan Revirulensi Bakteri *A. hydrophila*

Revirulensi bakteri *A. hydrophila* dilakukan dengan menumbuhkan bakteri pada medium *blood agar* 5 % + ampicilin dengan teknik purifikasi agar mendapatkan satu koloni tiap inokulasi. Kemudian di Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Proses tersebut dilakukan berulang selama 3 kali secara seri seperti pada Gambar 3.4.



Gambar 3.4 Proses Revirulensi Bakteri *A. hydrophila* AKS

## 10. Uji Patogenisitas Bakteri *A. hydrophila* pada Ikan Gurami (*Osphronemus gouramy*)

Dari isolat bakteri yang telah di revirulensikan diambil satu koloni tunggal untuk diaktivasi pada dengan medium 10 ml TSB lalu di inkubasi pada *Waterbath Shaker* pada suhu 28°C selama 24 jam dengan kecepatan 120 rpm. Setelah 24 jam, biakan bakteri kemudian dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer yang berisi 90 ml medium TSB kemudian diinkubasi lagi pada suhu 28°C selama 5 jam dengan kecepatan 120 rpm. Selanjutnya, biakan di sentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm 3 menit kemudain dicuci dengan NaCl 0,85% dengan cara menambahkan NaCl 0,85% serta sentrifugasi kembali selama satu menit. Selanjutnya, pelet bakteri dilarutkan dalam 5 ml NaCl 0,85 %. Kemudian di encerkan 100 x dengan NaCl 0,85 %. Hasil pengenceran tersebut, diperiksa tingkat kekeruhannya dengan spektrofotometer dan dibandingkan dengan persamaan yang didapat dari kurva baku bakteri *A. hydrophila* AKS untuk melihat jumlah perkiraan bakteri. Persamaannya dapat dilihat pada gambar 3.5

$$y = 1,4743x + 8,1921$$

x = Nilai absorbansi yang didapatkan  
y = log jumlah bakteri

Gambar 3.5 Persamaan Kurva Baku *A. hydrophila* AKS.

Setelah nilai absorbansi bakteri didapatkan, selanjutnya nilai absorbansi tersebut dimasukan ke dalam persamaan di atas. Kemudian nilai log jumlah bakteri bisa didapatkan. Setelah itu, nilai log jumlah bakteri dibuat anti log dari nilai log jumlah bakteri tersebut menggunakan kalkulator statistik. Nilai anti log

jumlah bakteri merupakan nilai perkiraan bakteri yang sebenarnya. Setelah mendapatkan nilai perkiraan jumlah bakteri sebenarnya, kultur bakteri yang sudah diperiksa optikal densitinya, di tetapkan angka di depannya menjadi 1. Setelah itu, kultur tersebut dibuat pengenceran serial sampai mencapai bakteri  $1 \times 10^5$  CFU/ml. Proses penyuntikan dilakukan dengan tingkat kepadatan sel sebesar  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^6$  dan  $1 \times 10^8$  CFU/ikan (lampiran 4).

Sebelum disuntikan dengan bakteri, terlebih dahulu ikan direndam dalam air dingin yang berisi es  $\pm$  satu menit. Bakteri *A. hydrophila* diinjeksikan dengan volume bakteri penyuntikan yaitu sebanyak 0,1 ml di daerah rongga perut bagian intra peritorial. Jumlah ikan yang digunakan adlah 6 ekor tiap akuarium dengan 2 kali pengulangan.

Pengamatan intensif selama 24 jam penuh, selanjutnya dilakukan pengamatan setiap 24 jam sekali selama 96 jam. Ciri-ciri infeksi, berupa luka atau borok menandakan ikan sudah terinfeksi bakteri. Dari hasil luka borok atau organ dalam di inokulasi kembali ke dalam media Rimler-Shoot, untuk memastikan ikan mati karena bakteri *A. hydrophila*.



## ALUR PENELITIAN

