

**UJI METODA PEMELIHARAAN LARVA AXENIC
SEBAGAI METODA UNTUK UJI IN-VIVO BAKTERI
PADA LARVA IKAN SEA BASS (*DICENTRARCHUS LABRAX*)**

LAPORAN PENELITIAN MANDIRI

Roffi Grandiosa, S.Pi., M.Sc.
NIP. 19750716 200112 1 003



UNIVERSITAS PADJADJARAN
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
PROGRAM STUDI PERIKANAN
JATINANGOR

2010

Uji Metoda Pemeliharaan Larva *Axenic* Sebagai Metoda
untuk Uji In-Vivo Bakteri
Pada Larva Ikan Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*)

R. Grandiosa. 2010. Laboratorium Akuakultur
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Padjadjaran

ABSTRACT

Disease is the main constraint to aquaculture therefore the disease controlling strategies must be used. An experimental strategy is to study the functioning of the host in the absence of bacteria and then to evaluate the effects of adding a single or defined population of microbes, or certain compounds (under gnotobiotic conditions). The main purpose of this study was to investigate the effect of the addition of selected bacteria strains on the survival of axenic sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. The influence of selected bacteria strains of *L. anguillarum* (HI-610, initially isolated by Bergh, Norway) and *Aeromonas hydrophila* (LVS 3) upon axenic sea bass larvae was examined.

The method to produce axenic larvae starting with disinfection of eggs with glutaraldehyde and application of incubation methods with antibiotics was investigated. A 3-minute exposure of eggs to 100 mg/L of glutaraldehyde under sterile conditions resulted in axenic eggs. Incubation of eggs in autoclaved sea water containing 10 mg/L of ampicillin and 10 mg/L of rifampicin, was successful to keep the sea bass eggs axenic. The hatching and hatching rate of axenic eggs was significantly lower compared to the xenic eggs in several experiments of this study. Addition of *Aeromonas hydrophila* (LVS3) did not significantly affect the survival compared to the survival of axenic larvae. However, the strain HI-610 of *L. anguillarum* was pathogenic to sea bass larvae causing a significantly lower survival. Bacteria were introduced to the axenic culture medium on DAH 3 and caused significant mortality on DAH 7 and DAH 11.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, *Listonella anguillarum*, axenic Sea Bass, gnotobiotic

ABSTRAK

Penyakit adalah hambatan utama pada akuakultur sehingga upaya pengendaliannya harus direncanakan. Strategi eksperimental adalah untuk mempelajari fungsi ikan sebagai inang tanpa kehadiran bakteri dan mengevaluasi kehadiran populasi bakteri mikroba pada ikan axenic (di bawah kondisi gnotobiotik). Tujuan utama adalah untuk mempelajari pengaruh penambahan bakteri tertentu terhadap kelangsungan hidup larva sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Pengaruh bakteri *L. anguillarum* (HI-610, diisolasi di Bergh, Norway) dan *Aeromonas hydrophila* (LVS 3) terhadap larva sea bass axenic dipelajari.

Metoda untuk memproduksi larva aksenik diawali dengan disinfeksi telur ikan dengan glutaraldehyde dan mengaplikasikan antibiotik. Perendaman telur selama 3 menit terhadap 100 mg/L glutaraldehyde di bawah kondisi steril dilakukan untuk memperoleh telur axenic. Media inkubasi telur berupa air laut yang sebelumnya telah diautodave ditambahkan 10 mg/L ampicillin dan 10 mg/L rifampicin, dan metoda ini cukup efektif untuk mempertahankan kondisi axenic. Penambahan bakteri *Aeromonas hydrophila* (LVS3) tidak berpengaruh terhadap kelangsungan hidup larva aksenik, akan tetapi strain HI-610 dari *L. anguillarum* ternyata patogenik terhadap laarva ikan sea bass sehingga menyebabkan kelangsungan hidup ikan yang rendah. Bakteri diintroduksi pada media kultur aksenik pada hari ke-3 dan menyebabkan kematian pada hari ke-7 dan hari ke-11.

Kata Kunci : *Aeromonas hydrophila*, *Listonella anguillarum*, Sea Bass aksenik, gnotobiotik

PENDAHULUAN

Kontribusi akuakultur untuk memasok ikan, krustasea, moluska dan hewan air lainnya sebagai komoditi yang diminati konsumen terus tumbuh. meningkat dari 3,9 persen dai total berat produksi produk perikanan dunia pada tahun 1970 menjadi 27,1 persen pada tahun 2000 dan 32,4 persen pada tahun 2004. Akuakultur tumbuh lebih cepat dari sektor produksi hewan lainnya. Data statistik menunjukkan, sektor ini telah berkembang pada tingkat rata-rata 8,8 persen per tahun sejak tahun 1970, dibandingkan dengan hanya 1,2 persen untuk perikanan tangkap dan 2,8 persen untuk sistem produksi daging ternak terrestrial selama periode yang sama. Produksi budidaya ikan telah melampaui laju pertumbuhan penduduk, dengan pasokan per kapita untuk budidaya ikan meningkat dari 0,7 kg pada 1970 menjadi 7,1 kg pada tahun 2004, dengan tingkat pertumbuhan rata-rata tahunan sebesar 7,1 persen (FAO, 2007).

Di Eropa, ikan *Sea Bass* (*Dicentrarchus labrax*) merupakan komoditi industri akuakultur yang tumbuh kuat dalam dekade terakhir ini. Pusat produksi ikan *Sea Bass* antara lain di Yunani, Turki, dan Italia. *Sea Bass* merupakan komoditi akuakultur yang memiliki potensi tinggi terutama di daerah Mediterania. Dalam waktu kurang dari 15 tahun, produksi meningkat dari beberapa ribu ton menjadi 57 000 ton, setelah mencapai puncaknya pada hampir 71 000 ton pada tahun 2000. Setelah tahun 2000 produksi menurun namun tetap terjadi ekspansi wilayah akuakultur dari spesies ini. Total produksi dari semua negara menurun dari puncaknya hampir 71 000 ton pada tahun 2000 menjadi 57 000 ton pada tahun 2002. Kecenderungan penurunan produksi ikan setara dengan melemahnya hasil produksi perikanan tangkap dan kecenderungan meningkatnya permintaan konsumen akan produk akuakultur (FAO, 1999).

Akuakultur telah memberikan studi bagi ketergantungan masyarakat akan hasil tangkapan dan berdampak pula bagi penciptaan lapangan kerja baru dan bisnis (FAO, 1999; Mac Allister Elliot *et al.*, 1999). Kecenderungan akuakultur saat ini adalah intensifikasi terhadap peningkatan produksi namun permasalahan penyakit ikan menjadi kendala utama terhadap intensifikasi kegiatan budidaya. Industri akuakultur terkendala akibat berbagai patogen virus, bakteri, jamur dan parasit (Reantaso *et al.*, 2005).

Peningkatan substansial dalam produksi spesies *Sea Bass* telah dimungkinkan karena perbaikan dalam teknologi akuakultur dan juga penyempurnaan produksi benih pada tahap pembenihan *hatchery* (FAO, 1999). Namun demikian, ikan *Sea Bass* tak luput dari berbagai penyakit yang menghinngap pada saat pemeliharaan antara lain diakibatkan wabah penyakit bakteri, virus dan parasit sehingga menjadi faktor pembatas utama dalam pengembangan dan keberlanjutan jangka panjang dari pembenihan ikan laut. Vibriosis yang disebabkan *Vibrio* (*Listonella*) *anguillarum* adalah salah satu penyakit utama pada akuakultur ikan laut (Toranzo *et al.*, 2005). Dampak dari serangan patogen bakteri adalah ketergantungan berat terhadap obat-obatan antibiotik yang pada gilirannya memberikan kontribusi terhadap terciptanya agen penyakit baru dan bahkan lebih agresif. Wabah penyakit ini memiliki dampak penting pada produksi komersial dari akuakultur dan dapat menjadi faktor penghambat untuk ekspansi industri di beberapa negara. Meskipun ratusan juta larva ikan dapat diproduksi dan dikomersialisasikan namun mortalitas tinggi dan kematian tidak dapat diprediksi (seringkali kematian mencapai lebih dari 80%) pada minggu pertama kehidupan ikan setelah menetas sehingga masih menjadi masalah yang menantang untuk dipecahkan.

Menurut Subasinghe (1997), strategi pengendalian penyakit akuakultur harus disertai dengan a) pengendalian kualitas dan aplikasi sistem yang lebih efisien dan hemat biaya pada komponen air, benih dan pakan, b), peningkatan peranan nutrisi yang baik untuk meningkatkan kesehatan hewan akuatik, c) pemanfaatan mekanisme pertahanan spesifik dan non spesifik inang dalam mengendalikan penyakit hewan air; d) pengembangan vaksin yang terjangkau dan efisien bagi ikan ekonomis penting; e) penggunaan immunostimulan dan bahan peningkat kekebalan non-spesifik untuk mengurangi kerentanan terhadap penyakit; dan f) penggunaan probiotik dan bioaugmentasi untuk peningkatan kualitas lingkungan perairan.

Untuk dapat memberikan solusi alternatif bagi penanggulangan penyakit dengan alternatif seperti penggunaan probiotik, (Verschuere *et al.*, 2000), prebiotik dan immunostimulan (Sakai 1999), sebuah pemahaman yang mendalam harus diterapkan terhadap interaksi antara tuan rumah dan mikroorganisme tersebut. Beberapa pertanyaan mendasar yang perlu dijawab seperti bagaimana mikroorganisme dapat menghinggapi larva ikan yang baru menetas, bagaimana bakteri dapat mempertahankan diri di dalam saluran pencernaan, apa pengaruh mikroorganisme patogen pada perkembangan larva dan pencernaan dan juga bagaimana sistem kerja imunologi pada larva ikan.

Metoda penelitian yang dilakukan dalam penelitian mikrobiologi penyakit ikan pada fase larva biasa dilakukan dengan prosedur penelitian *in vitro* dan *in vivo*. Prosedur untuk penelitian mikroba dengan sistem subjek *in vitro* adalah penelitian mikrobiologi yang dilakukan pada lingkungan yang terkendali (seperti Petridish atau Test Tube) sementara prosedur penelitian untuk mikroba dengan metoda *in vivo* adalah prosedur penelitian dengan menggunakan organisme yang hidup dengan cara mengaplikasikan mikroorganisme baik patogen maupun probiotik secara langsung pada ikan. Metoda *in vivo* lebih aplikatif untuk melihat dampak mikroorganisme ataupun senyawa-senyawa tertentu secara langsung pada larva ikan namun kekurangan dari sistem *in vivo* adalah tingginya variabilitas lingkungan dan faktor stokastik yang seringkali muncul pada saat melakukan penelitian mikrobiologi pada fase larva.

Beberapa penelitian mikrobiologi yang telah dilakukan pada fase larva ikan telah melaporkan dampak faktor stokastik semisal bervariasinya komunitas mikrobial pada larva ikan Cod (*Gadus morhua*) yang dipelihara di akuarium yang sama (Fjellheim *et al.*, 2006). Pada sistem pemeliharaan larva ikan secara konvensional dapat dikatakan komposisi bakteri pada setiap ikan sangat dinamis sehingga hasil penelitian akan tidak sama bila diulang. Berdasarkan

hal tersebut, diperlukan sistem uji yang mengurangi variabilitas faktor lingkungan dengan mengadopsi teknik pemeliharaan organisme gnotobiotik pada sistem pemeliharaan larva ikan. Beberapa organisme akuatik telah dibudidayakan pada kondisi bebas mikroba atau *axenic* adalah organisme ikan, moluska, krustasea, rotifer, echinoderm, cnidaria, turbellaria, ascidia dan echiurans. (Verschuere *et al.*, 1997).

Pengertian organisme gnotobiotik adalah organisme yang hidup tanpa kehadiran organisme lain setelah melalui tahapan sterilisasi (Gordon dan Pesti, 1971). Pemeliharaan organisme gnotobiotik dalam lingkungan *axenic* sebagai model untuk penelitian memberikan kemudahan bagi peneliti untuk memahami pengaruh penambahan mikroba ataupun senyawa tertentu terhadap organisme gnotobiotik yang sebelumnya hidup bebas dari mikroorganisme.

Verner-Jeffreys *et al.* (2003) dan Munro *et al.* (1995) telah melaporkan hasil penelitian mengenai pemeliharaan larva gnotobiotik untuk ikan Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) dan Turbot (*Scophthalmus maximus*) pada kondisi *axenic* atau tanpa kehadiran bakteri pada ikan. Pada uji pemeliharaan ikan Turbot, kehadiran bakteri divalidasi dengan mengkultur ulang pada *marine agar*. Contoh interaksi inang dan mikroba lebih banyak dilakukan terhadap *Artemia* sebagai hewan uji. Gunther and Catena (1980) meneliti interaksi antara tiga spesies *Vibrio* (*Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* dan *V. anguillarum*) and nauplii *Artemia* sp. Bebas bakteri. Rico-Mora and Voltolina (1995) mengevaluasi pengaruh dari lima strain bakteri yang berasal dari kultur diatom (*Skeletonema costatum*) yaitu (dua strain *Vibrio* sp., *Flavobacterium* sp., *Pleisiomonas* sp. dan *Aeromonas* sp.) serta dua patogen (*V. parahaemolyticus* dan *V. alginolyticus*) terhadap nauplii *Artemia franciscana axenic*. Hasil yang diperoleh adalah patogenitas dari kedua strain *Vibrio*, sementara lima strain yang disebutkan di awal tidak berdampak negatif terhadap *Artemia*. Gomez-Gil *et al.* (1998) mengevaluasi bioenkapsulasi dari *V. parahaemolyticus* (strain HL57) yang bersifat patogen dan *V. alginolyticus* (C7b) yang bersifat probiotik terhadap nauplii *A. franciscana*. Efisiensi nauplii *Artemia* dipengaruhi oleh sifat bakteri dan cenderung lebih rendah kelangsungan hidupnya bila diekspos dengan bakteri patogen.

Teknologi saat ini berkembang dengan hadirnya teknik deteksi untuk bakteri yang tidak dapat dikultur (Amann *et al.*, 1995). Mengingat pentingnya untuk mempelajari pengaruh interaksi mikroba dan inang secara *in vivo* terhadap larva ikan maka penyempurnaan uji metoda pemeliharaan larva *Sea Bass axenic* dilakukan dengan menguji metoda disinfeksi ikan dan

mengevaluasi penambahan bakteri *Listonella anguillarum* dan *Aeromonas hydrophila* pengaruh bakteri pada ikan pada kondisi *axenic*. Komparasi antara kultur larva ikan *axenic* dan *xenic* dilakukan untuk mengevaluasi sistem *axenic*.

BAHAN DAN METODA

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Aquaculture Ghent University pada bulan Mei hingga Juni 2007.

Penyediaan Ikan Axenic

Larva *axenic* ikan Sea Bass diproduksi dengan cara membesarkan ikan dari tahapan telur pada kondisi steril tanpa bakteri. Telur ikan berasal dari Ecloserie Marine in Gravelines, France. Telur ikan diaklimatisasi dengan kondisi media kultur dengan cara telur ditampung terlebih dahulu pada corong fiber dengan suhu dipertahankan pada $16 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ dan salinitas 36 g/L. Air disirkulasikan dan diperlakukan dengan penyinaran U.V. untuk mencegah kontaminasi mikroba.

Larva ikan *axenic* diperoleh dengan melakukan disinfeksi pada 24,000 telur *axenic*. Pengerjaan disinfeksi dilakukan dalam *laminar flow* (ruang steril) dalam kondisi steril. Telur yang akan digunakan disaring dengan menggunakan saringan nylon steril lalu dibilas dengan air laut untuk menghilangkan mikroba pada permukaan telur. Telur didisinfeksi dengan larutan glutaraldehyde sebanyak 200 ppm (FLUKA 49629, Glutaraldehyde solution technical, ~ 50% in H₂O) selama 3 menit. Telur kemudian dipindahkan ke beaker glass yang berisi 400 ml air laut yang telah diautoclave. Telur diinkubasi dalam 24 botol Schott yang masing-masing diisi 600 telur. Setiap botol Schott ditambahkan rifampicin (10 µg/L) dan ampicilin (10 µg/L). Dari tiap perlakuan, 2 x 96 telur disimpan dalam 96 well multi-well plate, untuk mengevaluasi pengaruh disinfeksi terhadap derajat penetasan dari larva Sea Bass

Larva ikan *xenic* dipelihara dari penetasan telur yang tidak steril. Telur ikan tersebut disimpan di corong 10 L dan dipertahankan pada suhu 16°C.

Bakteri Uji

Strain bakteri yang digunakan untuk menguji sistem *axenic* dan melihat respon larva ikan terhadap bakteri adalah *L. anguillarum* HI-610 (sebagai kandidat patogen) dan *A. hydrophila* LVS 3 (sebagai bakteri non patogen). Kedua strain bakteri uji dibuat resisten dengan cara memelihara bakteri pada rifampicin lalu ditumbuhkan pada media marine broth (Oxoid, Basingstoke, UK) lalu diagitasi pada shaker dan dipelihara pada suhu 16⁰ C.

Prosedur untuk membuat bakteri resisten dilakukan dengan cara menambahkan 1 ppm rifampicin dalam marine broth. Setelah bakteri dikultur selama 3 hari, bakteri yang masih hidup diekspos pada konsentrasi yang lebih tinggi yaitu 5 ppm. Kultur bakteri ditingkatkan daya resistensinya hingga dapat resisten pada konsentrasi 100 ppm. Bakteri dipreservasi pada suhu -80⁰C dan digunakan kembali bila perlu.

Pada setiap uji, bakteri diukur pada O.D. 550 nm dengan spektrofotometer (Genesys 20, Thermospectronic) dan untuk mendapatkan bakteri sejumlah 1.2 x 10⁹ cells/ml maka spektrofotometer harus setara dengan nilai absorban 1. Bakteri sejumlah 10⁵ CFU/ml ditambahkan pada media kultur, 3 hari setelah ikan menetas.

Stok Larva Ikan

Telur sea bass biasanya menetas 4 hari setelah fertilisasi pada suhu 16⁰C. Larva yang baru menetas dimasukkan pada 160 vial pada kondisi steril. Vial sebelumnya disterilisasi dengan lampu UV selama 24 jam untuk menghilangkan kontaminasi kemudian diisi 10 ml air steril. Vial yang terisi media kultur kemudian ditambahkan 10 µg/L of rifampicin untuk mempertahankan axenitas. Larva sea bass *axenic* kemudian ditempatkan pada beaker glass steril berukuran 500 ml sejumlah 30 buah dan masing-masing beaker glass diisi 10 µg/L rifampicin. Sea bass yang tidak steril ditempatkan pada beaker glass yang diisi air laut sejumlah 500 ml kemudian disimpan larva ikan Sea Bass dengan kepadatan 60 larva/L.

Analisa Kelangsungan Hidup

Kelangsungan hidup larva ikan *axenic* pada vial ditentukan pada hari ke-1, hari ke-3, hari ke-5, hari ke-7, hari ke-11. Kelangsungan hidup ikan yang tidak steril (*xenic*) ditentukan pada hari ke-4, hari ke-8 dan hari ke-12.

Kontrol Aksenitas

Uji aksenitas dilakukan terhadap telur dan ikan. Telur ikan diperiksa 24 jam setelah prosedur disinfeksi untuk memeriksa apakah ada kontaminasi pada telur. Sejumlah 30 telur ikan diambil dari 8 botol stok. Bahan yang digunakan adalah marine agar (Agar Bacteriological Grade, MP Biomedicals Inc., USA), marine broth (DIFCO) and NaCl murni. Sebanyak 1 ml telur dari setiap botol stok ditambahkan pada tabung steril yang mengandung 9 ml marine broth (10%). Tabung dan petridish diperiksa keesokan harinya.

Dari setiap botol yang digunakan untuk penelitian utama, 30 larva di homogenisasi lalu disimpan pada petridish yang terisi 10% Marine Agar (DIFCO). Pada akhir tahap stoking, 2 x 100 ml dari setiap ulangan di filter pada kertas saring steril 0,2 µl menggunakan Büchner filter. Filter kemudian ditempatkan pada petridish yang terisi marine agar. Hal tersebut dilaksanakan untuk menguji apakah media kultur tetap *axenic*.

Axenitas dari media kultur pada setiap vial dan beaker glass untuk perlakuan *axenic*, diuji dengan cara menyimpan 1 ml dari media kultur ke dalam 9 ml media broth lalu melihat apakah ada pertumbuhan bakteri.

Pengujian bakteri dalam larva ikan

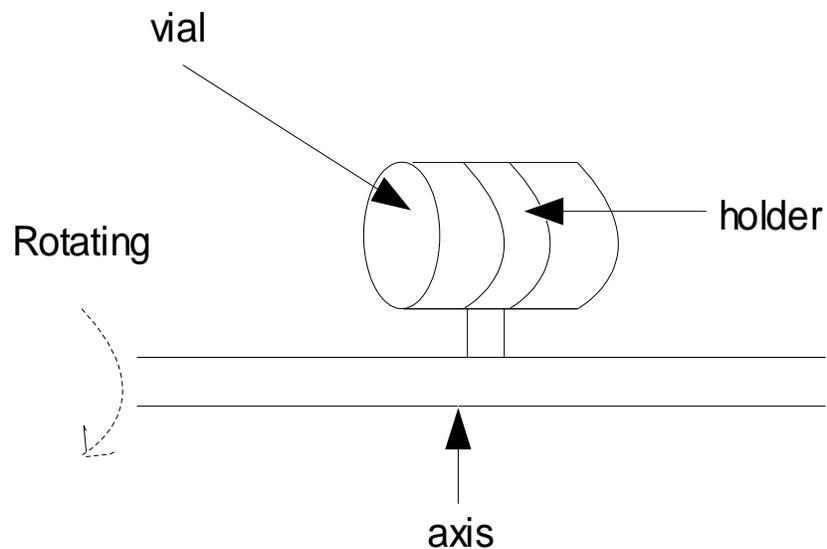
Untuk menentukan bakteri yang telah dikontaminasikan pada media kultur dan menentukan apakah bakteri menempel pada organ ikan maka larva ikan ditentukan dengan cara mengkultur jaringan ikan pada media marine agar. Prosedur ini penting untuk mengevaluasi penambahan bakteri dan apakah bakteri tetap bertahan pada ikan terutama organ pencernaan ikan sebagai organ target dimana bakteri menempatkan diri. Prosedur ini dilakukan untuk mengevaluasi kelangsungan hidup ikan setelah mengalami perlakuan bakteri dan kelangsungan hidup ikan dievaluasi pada hari ke-5, hari ke-7 dan hari ke-11.

Untuk mendeteksi bakteri dalam pencernaan ikan maka ikan yang masih hidup ditaruh diatas nylon filter dengan pori-pori 50-µm. Ikan kemudian di anestesi menggunakan 0.1% w/v benzocaine selama 10 detik pada air yang telah didestilasi, lalu dibilas pada larutan NSS yang telah terautoclave untuk menghilangkan bakteri pada permukaan. Sampel kemudian dihomogenisasi selama 5 menit dengan *stomacher blender* (Stomacher 400 Lab Blender, Seward Medical London U.K.) lalu diplat menggunakan spiral plater pada petridish yang terisi 10% marine agar dan rifampicin. Setelah prosedur plating, petridish kemudian diinkubasi selama 24

jam pada suhu ruangan, 24 jam pada suhu 25°C, dan 24 jam pada suhu 27°C. Petridish diperiksa setelah 72 jam inkubasi untuk memeriksa apakah ada pertumbuhan bakteri. Jumlah bakteri dihitung dengan menggunakan colony reader (Whitley Colony Viewer) dan jumlah colony forming unit (CFU) per ikan dihitung dan dijelaskan secara deskriptif.

Rancangan Penempatan Media Kultur Pada Penelitian Utama

Seluruh vial diisi dengan 10 ml air laut yang telah diautoclave lalu diisi masing-masing 10 ekor ikan. Vial sebelumnya disterilkan dengan U.V. selama 24 jam untuk disinfeksi. Vial kemudian ditaruh dengan mekanisme berputar pada rotor yang berputar sebanyak 4 rotasi per menit. Rotor memiliki aksis yang paralel terhadap aksis longitudinal. Penyimpanan larva ikan pada rotor dimaksudkan untuk tetap mempertahankan antibiotik dalam keadaan tersuspensi dalam air dan tidak mengendap.



Gambar 1. *Ilustrasi posisi rotor*

Pada perlakuan beaker glass, seluruh beaker glass sebelumnya diautoclave dan kemudian ditutup dengan aluminium foil untuk memproteksi ikan terhadap kontaminasi. Beaker glass kemudian diisi 0.5 L air laut yang telah diautoclave dan kemudian diisi dengan 30 larva.

Penelitian Utama

Penelitian ini ditujukan menguji pemeliharaan sistem untuk aksenik dan menentukan pengaruh uji in-vivo bakteri yaitu *Listonella anguillarum* dan *Aeromonas hydrophila* (LVS 3) terhadap larva *axenic* ikan sea bass. Penelitian ini secara umum akan menggambarkan bagaimana pengaruh metoda disinfeksi terhadap derajat penetasan, pengaruh metoda disinfeksi terhadap mikrobiologi, komparasi pengaruh penyimpanan ikan pada rotor dan pada beaker glass terhadap kelangsungan hidup ikan *axenic* dan komparasi kelangsungan hidup ikan *axenic* dan ikan tidak steril (*xenic*).

Untuk menguji kelayakan prosedur disinfeksi terhadap derajat penetasan maka penetasan dengan metoda *xenic* sebagai kontrol dibandingkan dengan penetasan dengan metoda *axenic* (Tabel 1).

Tabel 1. Kondisi Perlakuan Penetasan

No	Perlakuan	Keterangan
I	Kontrol (<i>xenic</i>)	Telur berada pada tanki air. Telur kemudian ditempatkan pada 2 plat multiwell 96 untuk memeriksa derajat penetasan
II	Disinfeksi telur dengan glutaraldehyde 100 ppm selama 3 menit kemudian melakukan inkubasi dengan rifampicin dan ampicilin	Telur ditempatkan pada 2 multiwell 96 untuk mengukur derajat penetasan. Telur yang akan digunakan selanjutnya diinkubasi dalam 24 botol Schott berukuran 500 ml yang mengandung 400 ml air laut yang sudah diautoclave. Jumlah telur adalah 600 telur per botol

Pada penelitian larva ikan *axenic*, semua vial diisi 10 larva *axenic* dalam 10 ml air laut steril. Vial ditambahkan 10 µg/L rifampicin untuk mempertahankan axenitas. Terdapat total 80 vial.

Tabel 2. Rancangan perlakuan untuk mengetahui pengaruh *Listonella anguillarum* and *Aeromonas hydrophila* (LVS 3) terhadap larva sea bass

Perlakuan	Perlakuan Bakteri		
	Axenic (tanpa bakteri)	Axenic + <i>L. anguillarum</i>	Axenic + LVS 3
.	I	II	III

Keterangan:

I – Larva *axenic* tanpa bakteri

II – Larva *Axenic* ditambahkan 10^5 CFU/ml *Listonella anguillarum* pada hari ke-3.

III – Larva *Axenic* ditambahkan 10^5 CFU/ml *Aeromonas hydrophila* pada hari ke-3.

Komparasi larva *axenic* dan *xenic* diteliti dengan menggunakan media pemeliharaan beaker glass. Seluruh beaker glass yang digunakan ditambahkan 0.5 L air laut steril dan diisi 30 larva sea bass. Larva ikan axenic dan xenic dikomparasi. Beaker glass yang terisi ikan axenic ditambahkan $10 \mu\text{g/L}$ rifampicin untuk mempertahankan kondisi steril.

Uji Statistik

Uji statistik dilakukan dengan Analisa Varians (ANOVA) melalui software SPSS 15. Kelangsungan hidup larva ikan sea bass diamati dengan cara menghitung jumlah ikan yang hidup setiap hari. Persentase kelangsungan hidup ikan diperoleh dengan menggunakan metode Royce (1972) dalam Effendie (1979).

$$SR = N_t/N_o \times 100\%$$

Keterangan :

SR = Survival Rate (%)

N_t = Jumlah larva ikan yang hidup pada akhir pengamatan (ekor)

N_o = Jumlah larva ikan pada awal pengamatan (ekor)

Jika terdapat perbedaan nyata antar perlakuan pada uji F maka dilanjutkan dengan uji jarak berganda Tukey pada taraf 5% (Gasperz, 1991). Jumlah bakteri yang teridentifikasi dibahas secara deskriptif.

PEMBAHASAN

Pengaruh disinfeksi dengan glutaraldehyde terhadap derajat penetasan

Derajat penetasan telur *axenic* dan *xenic* ditentukan dengan menghitung larva yang menetas pada mutiwell plate setelah menetas pada hari ke-1. Derajat penetasan dari telur *axenic* yang didisinfeksi dengan Glutaraldehyde 100 ppm dibandingkan derajat penetasan telur *xenic*.

Tabel 3. Perbandingan Derajat Penetasan Melalui Uji Tukey

Dosis	N	Subset	
		2	1
0 <i>xenic</i>)	4		41,0000
100 ppm	4		44,5000
Sig.		1,000	,504

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type I Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 17,500.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 4,000.

b Alpha = ,05.

Telur *axenic* diperiksa secara mikrobiologis untuk mengetahui apakah ada kontaminasi. Telur yang dihomogenisasi diambil 24 jam setelah disinfeksi ternyata tidak menunjukkan kontaminasi pada plat agar MA setelah 96 jam inkubasi. Hal ini menunjukkan prosedur disinfeksi yang dilanjutkan dengan inkubasi telur pada 10 mg/L rifampicin and 10 mg/L ampicillin sangat efisien sebagai langkah awal untuk memperoleh organisme *axenic*. Dikarenakan kepadatan telur ikan yang tinggi pada inkubator, telur ikan biasanya dapat terserang bakteri oportunistik (Hansen dan Olafsen, 1999). Beberapa perlakuan telah dilakukan untuk mendisinfeksi ikan. Salvesen dan Vadstein (1995) telah membandingkan empat jenis bahan kimia untuk disinfeksi telur ikan. Glutaraldehyde berperan lebih baik untuk disinfeksi permukaan telur (Salvesen *et al.*, 1997; Skjermo and Vadstein, 1999; Escaffre *et al.*, 2001; Morehead and Hart, 2003 dan Katharios *et al.*, 2007).

Glutaraldehyde adalah bahan sterilisasi yang memiliki karakter antimikroba, antifungi dan antiviral yang kuat (Gorman and Scott, 1980), namun efektivitasnya dipengaruhi oleh tahapan perkembangan telur, konsentrasi yang diaplikasikan dan lama kontak telur dengan larutan glutaraldehyde (Escaffre *et al.*, 2001).

Pengaruh Penambahan L. anguillarum dan A. hydrophila terhadap Kelangsungan Hidup Ikan

Aeromonas hydrophila saat ini diasosiasikan sebagai patogen penyakit pada ikan air tawar (Kumari dan Sahoo, 2006; Sahu *et al.*, 2007). Pada penelitian yang dilakukan Munro *et al.* (1995), *Aeromonas* sp. strain C39 tidak meningkatkan kematian larva ikan turbot walaupun bakteri ditemukan dalam jumlah yang tinggi dalam air dan saluran pencernaan. Strain bakteri *Aeromonas hydrophila* yang digunakan pada penelitian ini (LVS 3) sebelumnya telah memiliki dampak positif terhadap kelangsungan hidup dan pertumbuhan juvenil *Artemia* sp. (Verschuere *et al.*, 1999). Dari hasil pengamatan, *A. hydrophila* strain LVS 3 tidak menyebabkan peningkatan kematian larva ikan dari hari ke-3 hingga hari ke-12.

Bakteri ini tidak dapat direisolasi dari pencernaan ikan dikarenakan beberapa kemungkinan antara lain kematian bakteri yang tinggi dalam vial, tidak dikonsumsi oleh ikan sehingga *A. hydrophila* tidak menempel di saluran pencernaan, bakteri dicerna oleh ikan atau kepadatan berada di bawah ambang batas deteksi. Bakteri dapat menjadi tidak dapat dikultur bila berada pada suhu rendah dan berada dalam proses starvasi (Wong and Wang, 2004; Vattakaven

et al., 2006; Du *et al.*, 2007). Bakteri kemungkinan tidak mengalami kematian karena sebelumnya *A. hydrophila* dikultur pada (10% Marine agar), yang terkondisikan isotonik dan isothermik terhadap larva ikan dan juga bakteri ini terbiasa dalam kondisi air laut (Verschuere *et al.*, 1999). Hampir dipastikan sel *A. hydrophila* dikonsumsi oleh larva ikan. Larva ikan laut minum air laut sebelum dia memulai tahapan makan (Tytler dan Ireland, 1994) dan Reitan *et al.* (1998) melaporkan terdapat gejala hilangnya bakteri sejumlah 10-100 kali lebih tinggi dibanding laju minum dari larva turbot. Bakteri *Aeromonas hydrophila* diberikan pada ikan lewat *Artemia* ($1.1 \pm 0.6 \times 10^4$ cfu per *Artemia*) pada hari ke-7 sehingga larva ikan diduga mengkonsumsi bakteri. Namba *et al.* (2007) telah menemukan bahwa kebanyakan bakteri yang memiliki adhesi tinggi pada saluran pencernaan termasuk pada golongan *Aeromonas*. Terdapat kemungkinan larva ikan membentuk enzim pencernaan mulai hari ke-3 (Cahu and Zambonino-Infante, 2001). Dikarenakan laju pengosongan lambung yang cepat (Vine *et al.*, 2006) dan pertumbuhan bakteri LVS3 pada suhu 16°C maka bakteri diuga cepat hilang dan tidak terdeteksi ketika dilakukan uji mikrobiologis.

Listonella anguillarum merupakan bakteri yang diasosiasikan sebagai patogen pada Sea Bass (Romestand *et al.*, 1993). *Listonella anguillarum* telah digunakan sebagai bakteri uji pada ujiantang pada ikan Turbot (Chair *et al.*, 1994; Munro *et al.*, 1995; Planas *et al.*, 2005), halibut (Verner-Jeffreys *et al.*, 2003; Skjermo and Bergh, 2004) dan Atlantic cod (Kettunen and Fjalestad 2006 dan Seljestokken *et al.*, 2006). Ikan uji diinfeksi melalui uji perendaman (Kettunen and Fjalestad, 2006 dan Seljestokken *et al.*, 2006) atau menggunakan rotifer atau *Artemia* (Chair *et al.*, 1994, Munro *et al.*, 1995 dan Skjermo and Bergh, 2004) sebagai vektor penyakit. Pada budidaya ikan Sea Bass, larva ikan Sea Bass diberikan pakan *Artemia* sp. Sebagai pakan awal (Chatain, 1997). Pada penelitian ini, *L. anguillarum* ditambahkan pada air pada hari ke 3 dan juga melalui bioenkapsulasi pada *Artemia* (Chair *et al.*, 1994) pada hari ke-7. Pada larva ikan, bakteri dapat masuk pada ikan melalui sistem pencernaan (Tytler and Ireland, 1994, Reitan *et al.*, 1998). Pada hari ke-5, *L. anguillarum* dapat direisolasi dari larva ikan sea bass. Peningkatan kematian ikan diobservasi ketika ikan *axenic* diuji tantang dengan *L. anguillarum*. Uji tantang dengan perendaman dapat pula menyebabkan mortalitas pada ikan, hal ini sejalan dengan hasil uji (Seljestokken *et al.*, 2006) yang merendam ikan Turbot dengan suspensi bakteri selama 1 jam.

Uji sistem gnotobiotik

Kolonisasi larva akuatik dapat dikatakan cukup stokastik dikarenakan variabilitas data pada tiap ulangan terutama untuk melihat hubungan mikroorganisme dalam inang. Rawls *et al.* (2004) telah memelihara zebrafish gnotobiotik untuk mempelajari hubungan interaksi antara inang dan mikroorganisme yang membentuk koloni pada ikan. Zebrafish dan ikan Sea Bass sangat berbeda mengingat larva ikan laut biasanya memiliki tahap larva yang lebih lama dan harus diberi pakan zooplankton seperti *Brachionus* spp. Dan *Artemia* spp. Kelangsungan hidup larva ikan di tingkat pembudidaya komersil sangat rendah sehingga untuk mempelajari fenomena tersebut maka sistem eksperimen yang jelas harus diteliti mengingat sistem eksperimen seperti sistem gnotobiotik akan memungkinkan untuk mempelajari pengaruh komunitas mikroba yang berbeda pada kelangsungan hidup inang dan metabolisme inang. Sistem gnotobiotik memungkinkan pula mengetahui komposisi mikrobial sehingga diketahui secara tepat pengaruh mikroba probiotik, namun walaupun kondisi pada budidaya sebenarnya lebih kompleks namun uji gnotobiotik yang telah dilakukan pada ikan Sea Bass dapat berkontribusi positif untuk menyelesaikan permasalahan penetasan larva pada ikan laut yang tidak dapat diprediksi.

KESIMPULAN

1. Disinfeksi telur ikan dibawah kondisi aksenik dengan dosis 100 ppm dengan lama kontak 3 menit, cukup untuk menciptakan telur ikan aksenik.
2. Uji infeksi strain bakteri *Listonella anguillarum* dan *Aeromonas hydrophila* (LVS3) berdampak berbeda pada ikan. Strain *L. anguillarum* (HI-610) ditemukan sebagai patogen terhadap larva ikan Sea Bass sehingga menurunkan kelangsungan hidup. Bakteri yang dimasukkan pada media kultur pada hari ke-3 ternyata menyebabkan mortalitas tinggi pada hari ke-7 dan hari ke-11. Bakteri *Aeromonas hydrophila* tidak bersifat sebagai patogen mengingat bakteri tersebut tidak menempel pada saluran pencernaan.
3. Metoda untuk memproduksi larva *axenic* ikan Sea Bass dapat diandalkan mengingat hasil penelitian dapat direproduksi ulang sehingga uji metoda pemeliharaan larva axenic sebagai metoda untuk uji in-vivo bakteri pada larva ikan Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) dapat menjadi landasan untuk mempelajari relasi inang dan mikroba pada tahap berikutnya.

ACUAN PUSTAKA

- Amann, R.I., Ludwig, W., and Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59: 143–169.
- Cahu, C., and Zambonino-Infante, J. (2001) Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture* 200: 161–180.
- Chair, M., Dehasque, M., Van Poucke, S., Sorgeloos, P., and De Leenheer, A.P. (1994) An oral challenge for turbot larvae with *Vibrio anguillarum*. *Aquacu Int* 2: 270–272.
- Chatain, B. (1997) Development and achievements of marine fish rearing technology in France over the last 15 years. *Hydrobiologia* 358: 7–11.
- Du, M., Chen, J.X., Zhang, X.H., Li, A.J., and Li, Y. (2007) Characterisation and resuscitation of viable but nonculturable *Vibrio alginolyticus* VIB283. *Arch Microbiol* 188: 283–288.
- Effendie, M.I. (1979). *Biologi Perikanan*. Yayasan Pustaka Nusantara. Bogor. 163 hlm.
- Escaffre, A.M., Bazin, D., and Bergot, P. (2001) Disinfection of *Sparus aurata* eggs with glutaraldehyde. *Aquac Int* 9: 451–458.
- FAO. (1999). *The State of World Fisheries and Aquaculture, 1998*. FAO code: 43 AGRIS: M11; M12. FAO, Rome.
- FAO. (2007). *The State of World Fisheries and Aquaculture, 2006*. FAO ISBN 978-92-5-105568-7.
- Fjellheim, A.J., Playfoot, K.J., Skjermo, J., and Vadstein, O. (2006) Vibrionaceae dominates the microflora antagonistic towards *Listonella anguillarum* in the intestine of cultured Atlantic Cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Aquaculture* 269:98–106.
- Gasperz. (1991). *Metoda Perancangan Percobaan*. Armico. Bandung. 472 hlm.
- Gomez-Gil, B., Herrera-Vega, M., Abreu-Grobois, F. & Roque, A. (1998). Bioencapsulation of two different *Vibrio* species in nauplii of the brine shrimp (*Artemia franciscana*). *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (6): 2318-2322.
- Gordon, H.A. & L. Pesti. (1971). The gnotobiotic animal as a tool in the study of host microbial relationships. *Bacteriol. Rev.*, 35: 390-429.
- Gorman, S.P., and Scott, E.M. (1980) A review antimicrobial activity, uses and mechanism of action of glutaraldehyde. *J Appl Bacteriol* 48: 161–190.

- Gunther, D. & Catena, A. (1980). The interaction of *Vibrio* with *Artemia nauplii*. In: The Brine Shrimp *Artemia*– Ecology, Culturing and Use in Aquaculture, Vol. 1, Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O. and Jaspers, (Eds), Wetteren - Belgium, Universa Press, pp. 213–221.
- Hansen, G.H., and Olafsen, J.A. (1999) Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. *Microb Ecol* 38: 1–26.
- Katharios, P., Agathagelou, A., Paraskevopoulos, S., and Mylonas, C.C. (2007) Comparison of iodine and glutaraldehyde as surface disinfectants for red porgy (*Pagrus pagrus*) and white sea bream (*Diplodus sargus sargus*) eggs. *Aquac Res* 38: 527–536.
- Kettunen, A., and Fjalestad, K.T. (2006) Resistance to vibriosis in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): first challenge test results. *Aquaculture* 258: 263–269
- Kumari, J., and Sahoo, P.K. (2006) Dietary immunostimulants influence specific immune response and resistance of healthy and immunocompromised Asian catfish *Clarias batrachus* to *Aeromonas hydrophila* infection. *Dis Aquat Organ* 70: 63–70.
- Morehead, D.T., and Hart, P.R. (2003) Disinfection of striped trumpeter (*Latris lineata*) eggs with glutaraldehyde. *Aquac Int* 11: 255–260.
- Munro, P.D., Barbour, A., and Birkbeck, T.H. (1995) Comparison of the growth and survival of larval turbot in the absence of culturable bacteria with those in the presence of *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, or a marine *Aeromonas* sp. *Appl Environ Microbiol* 61: 4425–4428.
- Namba, A., Mano, N., and Hirose, H. (2007) Phylogenetic analysis of intestinal bacteria and their adhesive capability in relation to the intestinal mucus of carp. *J Appl Microbiol* 102: 1307–1317.
- Planas, M., Perez-Lorenzo, M., Vazquez, J.A., and Pintado, J. (2005) A model for experimental infections with *Vibrio listonella* anguillarum in first feeding turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae under hatchery conditions. *Aquaculture* 250: 232–243.
- Rawls, J.F., Mahowald, M.A., Goodman, A.L., Trent, C.M., and Gordon, J.I. (2007) In vivo imaging and genetic analysis link bacterial motility and symbiosis in the zebrafish gut. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 7622–7627.
- Reantaso, M.G., Subasinghe, R.P., Arthur, R.J., Ogawa, K., Chinabut, S., Adlard, R., Tan, Z. & Shariff, M. (2005). Disease and health management in Asian aquaculture. *Veterinary Parasitology*, 132: 249 -72.
- Reitan, K.I., Natvik, C.M., and Vadstein, O. (1998) Drinking rate, uptake of bacteria and microalgae in turbot larvae. *J Fish Biol* 53: 1145–1154.

- Rico-Mora, R. & Voltolina, D. (1995). Effects of bacterial isolates from *Skeletonema costatum* cultures on the survival of *Artemia franciscana* nauplii. *Journal of Invertebrate Pathology*, 66: 203–204.
- Romestand, B., Dragesco, A., Breuil, G., Coste, F., and Bouix, G. (1993) An ELISA technique for rapid diagnosis of vibriosis in sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Dis Aquat Organ* 15: 137–143.
- Sahu, S., Kumar Das, B., Pradhan, J., Mohapatra, B.C., Mishra, B.K. dan Sarangi, N. (2007) Effect of *Magnifera indica* kernel as a feed additive on immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* in *Labeo rohita* fingerlings. *Fish Shellfish Immunol* 23: 109–118.
- Sakai, M. (1999). Current research status of immunostimulants. *Aquaculture*, 172: 63-92.
- Salvesen, I. & Vadstein, O. (1995). Surface disinfection of eggs from marine fish; evaluation of four chemicals. *Aquaculture International*, 3: 155-171.
- Salvesen, I., Øie, G & Vadstein, O. (1997). Surface disinfection of Atlantic halibut and turbot eggs with glutaraldehyde: evaluation of concentrations and contact times. *Aquaculture International* 5: 249–258.
- Seljestokken, B., Bergh, Ø., Melingen, G.O., Rudra, H., Hetlelid Olsen, R., and Samuelsen, O.B. (2006) Treating experimentally induced vibriosis (*Listonella anguillarum*) in cod, *Gadus morhua* L., with florfenicol. *J Fish Dis* 29: 737–742.
- Skjermo, J., and Vadstein, O. (1999) Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture*. 177: 333–343.
- Skjermo, J., and Bergh, O. (2004) High-M alginate immunostimulation of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae using *Artemia* for delivery, increases resistance against vibriosis. *Aquaculture* 238: 107–113.
- Subasinghe, R. P. (1997). Review of the state of world aquaculture. FAO Fisheries Circular No. 886 FIRI/C886 (Rev.1). Rome.
- Subasinghe, R.P., Bondad-Reantaso, M.G. & McGladdery, S.E. (2001). Aquaculture development, health and wealth In: *Aquaculture in the Third Millennium. Technical Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millennium*, Bangkok, Thailand, 20-25 February 2000, Subasinghe, R.P., Bueno, P., Phillips, M.J., Hough, C., McGladdery, S.E. & Arthur, J.R., (Eds), *Aquaculture Development, Health and Wealth* NACA, Bangkok and FAO, Rome, pp. 167-191.
- Toranzo, A.E., Magariños, B., and Romalde, J.L. (2005) A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* 246: 37–61.

- Tytler, P., and Ireland, J. (1994) Drinking and water absorption by the larvae of herring (*Clupea harengus*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). *J Fish Biol* 44: 103–116.
- Vadstein, O., Øie, G., Olsen, Y., Salvesen, I. & Skjermo, J. (1993). A strategy to obtain microbial control during larval development of marine fish. In: *Fish Farming Technology - Proceedings of the First International Conference on Fish Farming Technology*, Reinertsen, H., Dähle, L.A., Jørgensen, L. & Tvinnereim, K. (Eds), Rotterdam, Balkema, pp. 67-75.
- Vattakaven, T., Bond, P., Bradley, G., and Munn, C.B. (2006) Differential effects of temperature and starvation on induction of the viable-but-nonculturable state in coral pathogens *Vibrio shiloi* and *Vibrio tasmaniensis*. *Appl Environ Microbiol* 72: 6508–6513.
- Verner-Jeffreys, D.W., Shields, R.J., and Birkbeck, T.H. (2003) Bacterial influences on Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* yolk-sac larval survival and start-feed response. *Dis Aquat Organ* 56: 105–113.
- Verschuere, L., Dhont, J., Sorgeloos, P., and Verstraete, W. (1997) Monitoring Biolog patterns and r/K-strategists in the intensive culture of *Artemia* juveniles. *J Appl Microbiol* 83: 603–612.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Huys, G., Dhont, J., Sorgeloos, P., and Verstraete, W. (1999) Microbial control of the culture of *Artemia* juveniles through preemptive colonization by selected bacterial strains. *Appl Environ Microbiol* 65: 2527–2533.
- Verschuere, L., Rombaut G, Sorgeloos, P. & Verstraete, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64: 655-671.
- Vine, N.G., Leukes, W.D., and Kaiser, H. (2006) Probiotics in marine aquaculture. *FEMS Microbiol Rev* 30: 404–427.
- Wong, H.C., and Wang, P. (2004) Induction of viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses. *J Appl Microbiol* 96:359–366.