

PENGARUH SUHU TERHADAP KELANGSUNGAN HIDUP *Aeromonas hydrophila* DALAM KONSERVASI JANGKA WAKTU LAMA

Siti Chotiah

Balai Besar Penelitian Veteriner
Jl. R.E. Martadinata No. 30, Bogor 16114

ABSTRACT

Effect of temperature to Survival of *Aeromonas hydrophila* in Long Term Conservation. *Siti Chotiah*. Maintenance of viability and character of microorganism ex situ conserved are the important thing to be considered. The aim of this study was to achieve the suitable and efficient monitoring in the microbial germ plasma preservation. Survival and characteristic of *Aeromonas hydrophila* Bbalitvet Culture Collection after 22 years ex situ conservation at room temperature and -15°C have been evaluated. A total of 42 lyophilized samples of 9 collections prepared in vacuum glass ampoules were grown on specific medium and identified for the bacterial species. The results showed that 9 of 9 (100%) collections and 5 of 9 (55,56%) collections of *A. hydrophila* were still viable to life after 22 years ex situ conservation at each -15°C and room temperature respectively. There was indicated that survival of lyophilized *A. hydrophila* after long term stored at -15°C is better than at room temperature.

Keywords: Survival, *Aeromonas hydrophila*, conservation, ex situ.

ABSTRAK

Memelihara viabilitas dan karakteristik mikroorganisme yang dikonservasi secara eks situ merupakan sesuatu hal penting yang perlu diperhatikan. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan cara pemantauan yang tepat dan efisien dalam pengelolaan plasma nutfah mikroba. Kelangsungan hidup dan karakteristik sumberdaya genetik mikroba *Aeromonas hydrophila* koleksi Bbalitvet Culture Collection pasca konservasi eks situ selama 22 tahun pada suhu kamar dan -15°C telah dievaluasi. Sebanyak 42 sampel biakan kering di dalam kemasan ampul gelas dalam kondisi vakum berasal dari 9 koleksi *A. hydrophila* yang telah disimpan selama 22 tahun pada 2 suhu yang berbeda telah ditumbuhkan dalam medium khusus, kemudian diuji viabilitas, kemurnian dan diidentifikasi sampai spesies. Hasil menunjukkan bahwa 9 dari 9 (100%) koleksi dan 5 dari 9 (55,56%) koleksi biakan *A. hydrophila* masih bertahan hidup setelah dikonservasi masing-masing pada suhu -15°C dan suhu kamar selama 22 tahun. Ini menunjukkan bahwa kelangsungan hidup koleksi biakan *A. hydrophila* pada suhu simpan -15°C lebih lama dibandingkan pada suhu kamar.

Kata kunci: Kelangsungan hidup, *Aeromonas hydrophila*, konservasi, eks situ.

PENDAHULUAN

Berbagai macam metode yang dipakai dalam preservasi mikroba yang dilakukan dalam koleksi kultur adalah metode *subculture*, *drying*, *freeze-drying* dan *freezing*. Akan tetapi tidaklah mudah dalam memilih metode yang terbaik untuk keperluan tertentu. Penentuan teknik pengawetan atau penyimpanan mikroba memerlukan penelitian yang rumit, jangka waktu lama, perlu pemantauan dan dana yang besar. Hal itu berkaitan dengan dua hal penting

dari tujuan pemilihan metode pemeliharaan mikroba adalah menghasilkan angka kelangsungan hidup yang maksimal dan menjaga stabilitas sifat genetiknya.

Menurut Snell (1991) pemilihan metode preservasi mikroba ditentukan sendiri oleh koleksi kultur masing-masing berdasarkan kemampuan fasilitas yang ada dan dana yang tersedia. Metode *freeze-drying* dipakai dalam konservasi sebagian besar koleksi mikroba di Bbalitvet *Culture Collection* (BCC), termasuk diantaranya untuk koleksi mikroba *A. hydrophila*. Metode *freeze-drying* yang dilakukan menggunakan medium preservan 7,5% glukosa serum (Lapage, *et al.*, 1970). Dalam proses *freeze-drying* menggunakan mesin Edwards EF4 Medulyo freeze-drier (Manor Royal, Crawley, West Sussex, UK) dilakukan pada suhu -40°C dengan dua tahapan pengeringan. Dalam kemasan ampul vakum biakan bakteri tersebut disimpan di dua tempat yang berbeda yaitu pada suhu kamar dan dalam freezer suhu -15°C . Dua puluh dua tahun kemudian dilakukan kontrol mutu (uji viabilitas, kemurnian dan reidentifikasi) terhadap koleksi biakan tersebut untuk mendapatkan cara pemantauan yang tepat dan efisien dalam pelestarian plasma nutfah mikroba tersebut.

Aeromonas (A.) hydrophila bakteri Gram-negatif berbentuk batang lurus dengan ujung bulat, tidak membentuk endospora dan dapat tumbuh pada temperatur rendah sampai 4°C dan bergerak menggunakan flagela polar. Bakteri tersebut hidup bebas di air segar, sering dijumpai pada binatang reptil, amfibi, ikan, hewan berdarah panas, tanah, makanan. Spesies ini sudah lama dikenal patogen pada ikan dan amfibi (Hazen *et al.*, 1978) dan dapat menyebabkan diare pada manusia (Agger *et al.*, 1985). Populasinya banyak terdapat dalam air dan dapat mencemari makanan sehingga disebut *food-and waterborne pathogen* (Wadstrom dan Liungh, 1991). Walaupun mikroba ini bersifat patogen baik pada ikan, ternak dan manusia, akan tetapi jika kita hati-hati dalam menanganinya maka manfaatnya akan lebih banyak misalnya sebagai bahan pembuat vaksin, bahan pembuat serum kebal dan bahan diagnostik. Untuk itu kita perlu melestarikannya supaya terjaga viabilitas dan karakternya.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan cara pemantauan yang tepat dan efisien dalam pengelolaan plasma nutfah mikroba di suatu culture collection.

MATERI DAN METODE

Biakan *Aeromonas hydrophila*

Sebanyak 42 sampel biakan plasma nutfah mikroba *A. hydrophila* di dalam kemasan ampul gelas dalam kondisi hampa udara yang berasal dari 9 koleksi yang disimpan pada suhu kamar tanpa pendingin (24 sampel) dan suhu -15°C (18 sampel) telah digunakan sebagai bahan penelitian. Biakan-biakan mikroba tersebut merupakan koleksi pada Bbalitvet *Culture Collection* (BCC) yang telah disimpan selama 22 tahun dengan metode preservasi *freeze drying* menggunakan medium preservan 7,5% glukosa serum. Sampel diambil secara acak sebanyak 2 ampul lebih dari setiap koleksi.

Uji Pertumbuhan dan Reidentifikasi

Masing-masing sampel ampul dicatat nomor koleksi dan tanggal proses *freeze-drying* (nomor batch). Kondisi fisik ampul diperiksa dan bagian luarnya dibersihkan dengan alkohol 70%. Membuka ampul dilakukan di dalam ruang biohazard, dengan bagian ampul yang terbuka diletakkan pada nyala api, kemudian 0,5 ml medium kaldu *brain heart infusion* (BHI)

dimasukkan kedalam ampul, isi ampul dilarutkan. Suspensi isi ampul dipindahkan ke dalam medium kaldu BHI volume 2 ml yang disiapkan dalam tabung *bijou* dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 8-12 jam. Kultur bakteri dalam medium tersebut selanjutnya dibiakkan pada lempeng agar darah yang mengandung 5% darah domba dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Koloni murni yang tumbuh diidentifikasi menurut prosedur Barrow dan Feltham (2003) dan Carter (1973). Identifikasi tahap pertama diuji dengan pewarnaan Gram, pergerakan dalam medium semi solid, aktifitas enzim katalase dan oksidase. Tahap kedua dilakukan uji terhadap: reduksi nitrat menjadi nitrit, pembentukan indol, fermentasi glukosa, hidrolisis arginin, aktifitas enzim urease, hidrolisis eskulin, hidro-lisis gelatin, aktifitas enzim β galaktosidase, asimilasi glukosa, arabinosa, mannososa, manitol, N-asetil-glukosamin, maltosa, potasium glukonat, asam kaprat, asam adipat, asam malat, trisodium sitrat, asam fenil asetat, sitokrom oksidase. Hasil reaksi dibaca menggunakan API system yaitu API 20 NE (Bio Merieux, Perancis).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kelangsungan hidup biakan *A. hydrophila* koleksi BCC dalam bentuk kering setelah penyimpanan selama 22 tahun pada suhu kamar dan suhu -15°C dipaparkan di dalam Tabel 1. Sebanyak 14 dari mua sampel yang diperiksa berasal dari 4 dari 9 (44,44%) koleksi biakan *A. hydrophila* masih tahan hidup setelah disimpan pada suhu kamar tanpa pendingin selama 22 tahun.

Dalam konservasi eks situ mikroba akan terjadi kematian sel-sel selama proses preservasi, dan kemudian akan hilang selama dalam penyimpanan (Snell, 1991). Koleksi Aeromonas yang ada di *National Collection of Type Cultures*, Inggris masih tahan hidup sampai 30 tahun penyimpanan dengan metode *freeze drying*, walaupun sudah tidak terhitung secara logaritma (Rudge, 1991).

Identifikasi terhadap 9 koleksi plasma nutfah mikroba *A. hydrophila* pasca konservasi eks situ selama 22 tahun pada suhu -15°C menggunakan API system, yaitu API 20 NE hasilnya dipaparkan didalam Tabel 2. Sebanyak 2 koleksi menunjukkan karakteristik ID 99,9%, 5 koleksi menunjukkan karakteristik ID 99,8%, 1 koleksi menunjukkan karakteristik.

Tabel 1. Kelangsungan hidup biakan *A. hygrophylla* koleksi BCC dalam bentuk kering setelah penyimpanan selama 22 tahun pada suhu kamar dan -15°C.

BCC	Asal isolasi (habitat)	Lama konservasi	Jumlah sampel		Viabilitas (%)	
			>18°C	-15°C	>18°C	-15°C
1606	Air ikan	22	3	2	0	100
1610	Air ikan	22	2	2	100	100
1617	Air ikan	22	4	2	100	100
1624	Ikan	22	2	2	100	100
1625	Ikan	22	2	2	100	100
1628	Ikan	22	3	2	0	100
1629	Air ikan	22	2	2	0	100
1685	Air ikan	22	2	2	0	100
1812	Air ikan	22	4	2	75	100
Jumlah			24	18	52,8	100

Tabel 2. Reaksi biokimia dari 9 koleksi plasma nutfah mikroba *Aeromonas hydrophila* pasca konservasi eks situ selama 22 tahun pada suhu -15°C.

Uji biokimia	Nomor koleksi BCC								
	1606	1610	1617	1624	1625	1628	1629	1685	1812
Potassium nitrat	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-triptopan	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-glukosa	-	+	+	+	+	-	-	-	+
L-arginin	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urea	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Eskulin feri sitrat	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatin	+	+	+	+	+	+	+	+	-
4-nitrofenil-βD-glaktopiranosida	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-glukosa	-	+	+	+	+	-	-	-	+
L-arabinosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N-asetil-glukosamin	+	+	+	-	+	+	+	+	+
D-maltosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Potassium glukonat	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Asam kaprat	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Asam adipat	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Asam malat	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trisodium sitrat	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Asam fenil asetat	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oksidase	+	+	-	+	+	+	+	+	-
Profil API 20 NE	3537	7577	7577	7776	7577	3537	3537	3537	7567
% ID	754	754	750	644	744	754	754	754	741
	99,8	99,9	99,9	99,7	99,8	99,8	99,8	99,8	93,6

ID 99,7% dan sisanya 1 koleksi menunjukkan karakteristik ID 93,6%.

KESIMPULAN

Telah dievaluasi sebanyak 42 sampel biakan kering di dalam kemasan ampul gelas dalam kondisi vakum berasal dari 9 koleksi *A. hydrophila* yang telah dikonservasi eksitu selama 22 tahun pada suhu kamar dan suhu -15°C. Kelangsungan hidup koleksi biakan *A. hydrophila* dalam konservasi eksitu dengan metode preservasi *freeze drying* akan lebih lama mempertahankan hidupnya jika disimpan dalam kondisi suhu simpan -15°C dibanding pada suhu kamar.

DAFTAR PUSTAKA

- Agger, W.A., J.D. McCormick, and M.J. Gurwith. 1985. Clinical and microbiological features of *Aeromonas hydrophila*-associated diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 21(6):909-913.
- Barrow, G.I. and R.K.A. Feltham. 2003. *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*. 3rd ed. Cambridge University Press, UK.
- Carter, G.R. 1973. *Diagnostic Procedure in Veterinary Microbiology*. 2nd ed. Charles, C. Thomas Publisher, Springfield, Illinois, USA. p: 85-87.
- Hazen, T.C., C.B. Fliermans, R.P. Hirsch, and G.W. Esch. 1978. Prevalence and distribution of *Aeromonas hydrophila* in the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 36:5731-738.
- Lapage, S.P., J.E. Shelton, T.G. Mitchell, and A.R. Mackenzie. 1970. Culture collection and the preservation of bacteria. *In Methods in Microbiology*. Volume 3A. Academic Press London and New York. pp. 130-228.
- Popof, M. 1984. *Aeromonas*. *In Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 1. Noel R. Krieg, Editor. Williams and Wilkins, Baltimore, USA. p. 545-550.

- Rudge, R.H. 1991. Maintenance of Bacteria by Freeze-drying. *In* Maintenance of Microorganisms and Cultured Cells. B.E. Kirsop and A. Doyle (*eds.*) Academic Press Limited. pp. 31-43.
- Snell, J.J.S. 1991. General Introduction To Maintenance Methode. *In* Maintenance of Microorganisms and Cultured Cells. B.E. Kirsop and A. Doyle (*eds.*) Academic Press Limited. pp. 21-30.
- Wadstrom, T. and A. Liungh.1991. Aeromonas and Plesiomonas as a food and waterborne pathogen. *Int. J. Food Microbiol.* 12(4):303-311.