

## Viability of *Edwardsiella tarda* and *Escherichia coli* preserved with glycerol-tryptone soy broth (TSB) kept at freezing temperature

### Viabilitas *Edwardsiella tarda* dan *Escherichia coli* dengan preservasi gliserol dalam tryptone soy broth (TSB) pada suhu beku

Abdur rohman<sup>1\*</sup>, Frans Ijong<sup>2</sup>, and I K. Suwetja<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Program Magister Ilmu Perairan, Pascasarjana, Universitas Sam Ratulangi, Jl. Kampus Unsrat Kleak, Manado 95115, Sulawesi Utara, Indonesia

<sup>2</sup> Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam Ratulangi  
\*E-mail: abdurrohman\_32@yahoo.com

**Abstract:** Preservation of bacteria carried out in relation to the collection and preservation of germ plasm microbe is useful for research and development or for the establishment of diagnostic tools. Glycerol is a good preservation media but it is not known what doses should be used for effective preservation. This research used two experimental methods consisting of 2 factors and 3 treatments. This study aimed to find the best glycerol concentration that can be used to preserve *Edwardsiella tarda* and *Escherichia coli* in the -20°C environment, to understand the viability of bacteria after being preserved and to describe the characteristics of the preserved bacteria. Treatments applied were 10%, 15% and 20% glycerol in TSB. Viability of the bacteria was analyzed after 7, 14, 28, 35, and 42 days of preservation. Results showed that *E.coli* bacteria preserved in 15% glycerol had the highest viability, i.e. 84% and preserved in 10% glycerol had the lowest viability, i.e. 80%. But for *E. tarda* bacteria preserved in 10% glycerol had the highest viability, i.e. 1.83% and preserved in 15% glycerol had the lowest viability, i.e. 0,55%.

**Keywords:** *Edwardsiella tarda*; *Escherichia coli*; glycerol

**Abstrak** Preservasi bakteri dilakukan dalam kaitannya dengan koleksi dan konservasi plasma nutfah mikroba yang berguna untuk penelitian dan pengembangan atau untuk pembentukan alat diagnosa. Gliserol merupakan bahan preservasi yang baik, tetapi belum diketahui dosis yang baik dan efektif untuk preservasi bakteri *Edwardsiella tarda* dan *Escherichia coli* pada suhu -20°C. Penelitian ini dilakukan dengan metode eksperimen yang terdiri dari 2 faktor dan 3 taraf perlakuan, masing-masing perlakuan dengan 3 kali ulangan, media preservasi yang digunakan adalah TSB dan gliserol dengan konsentrasi 10%, 15% dan 20%. Parameter yang diukur adalah viabilitas dan kecocokan/penyimpangan karakteristik biokimia. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Balai Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Manado, dari bulan September sampai dengan November 2013. Tujuan Penelitian ini adalah untuk menentukan konsentrasi gliserol dalam TSB sebagai media preservasi yang efektif dan efisien pada bakteri *Edwardsiella tarda* dan *Escherichia coli* yang dipreservasi dengan suhu -20°C dan disimpan selama 42 hari. Hasil penelitian menunjukkan adanya penurunan laju pertumbuhan bakteri selama preservasi. Persentase viabilitas bakteri *E. coli* yang tertinggi selama preservasi diperoleh dengan penggunaan gliserol konsentrasi 15% dengan jumlah 84% dan yang terendah adalah dengan penggunaan konsentrasi 10% yakni sebesar 80%, sedangkan untuk *E. tarda* persentase viabilitas bakteri yang tertinggi selama preservasi diperoleh dengan penggunaan gliserol konsentrasi 10% dengan jumlah 1,83% dan yang terendah adalah dengan penggunaan konsentrasi 15% yakni sebesar 0,55%. Berdasarkan uji statistik analisis variasi (ANOVA) didapat hasil F hitung *E. tarda* dan *E. coli* yang lebih besar dari F<sub>Tabel</sub> dengan tingkat kepercayaan 95 %.

**Kata-kata kunci:** *Edwardsiella tarda*; *Escherichia coli*; gliserol

## PENDAHULUAN

Indonesia yang terletak di daerah tropis merupakan sumber biodiversitas yang luas, termasuk mikroba baik yang merugikan maupun yang berguna bagi manusia. Mikroba tersebut, di samping beragam jenisnya, sangat mudah mengalami perubahan sifat

sehingga menjadi strain baru yang berbeda dengan aslinya. Hal ini dapat mempengaruhi biodiversitas.

Penentuan teknik penyimpanan atau pengawetan mikroba memerlukan penelitian yang cermat, waktu yang lama, evaluasi serta dana yang besar. Hal ini berkaitan dengan tujuan utama preservasi, yaitu: 1) mereduksi atau mengurangi

laju metabolisme dari mikroorganisme hingga sekecil mungkin dengan tetap mempertahankan viabilitas (daya hidupnya) dan memelihara sebaik mungkin biakan yang ada sehingga didapatkan angka perolehan (*recovery*) dan kehidupan (*survival*) yang tinggi dengan perubahan ciri-ciri yang minimum.

Pengkulturan yang dilakukan secara berulang-ulang akan menyebabkan kemungkinan terjadinya kontaminasi dan menurunnya daya patogen bakteri tersebut. Menurut Yuasa *et al.* (2003) bahwa metode preservasi dengan pembekuan dapat menghindari terjadinya penurunan kualitas. Ada beberapa cara pengawetan untuk berbagai jenis spesimen termasuk bakteri, dimana masing-masing cara pengawetan mempunyai kelebihan dan kekurangan. Cara pengawetan juga menentukan lama penyimpanan dan metode diagnosis yang akan dilakukan. Perubahan dari sifat-sifat bakteri dapat menimbulkan kekhawatiran karena pemutasian, sehingga dengan diagnosis yang tidak akurat dapat menimbulkan kekeliruan dalam pengambilan keputusan.

Bakteri *Edwardsiella tarda* telah dikenal merupakan hama penyakit ikan karantina (HPIK) yang termasuk pada golongan II (Kepmen KP, 2010), yakni bakteri yang sudah dapat disucihamakan, namun dalam tindakan penanganannya harus tetap dalam pengawasan yang ketat dan menggunakan prosedur khusus. Bakteri ini dapat dijumpai di lingkungan air tawar dan air laut, dengan suhu optimal bagi pertumbuhannya sekitar 35°C, sedangkan pada suhu di bawah 10°C atau di atas 45°C tidak dapat tumbuh.

Bakteri *Escherichia coli* (*E. Coli*) merupakan bakteri yang dapat menyebabkan keracunan makanan pada manusia. *Escherichia coli* dan *Edwardsiella tarda* merupakan penyebab infeksi *enteric* karena toksin yang diproduksi, invasi jaringan dan mekanisme lain. Untuk itu, diharapkan agar tindakan diagnosa di lapangan maupun di laboratorium jangan sampai mengalami kekeliruan maka kesediaan isolat yang baik dan aman sebagai bahan pembentukan alat diagnosa menjadi suatu kebutuhan dalam pelaksanaan tindak karantina ikan.

Pemilihan cara pengawetan perlu dipertimbangkan dengan cermat agar tujuan perlakuan dapat tercapai. Dalam hal ini cara pengawetan yang akan diteliti adalah pengaruh kondisi lingkungan dan waktu yang berbeda terhadap viabilitas awetan bakteri *Edwardsiella tarda* dan *E. coli* pada media *tryptone soya broth* (TSB) dengan kadar gliserol dan suhu penyimpanan yang berbeda selama 42 hari. Metode penyimpanan

jangka panjang yang paling efektif dan banyak dilakukan ialah metode liofilisasi (*lyophilization/freeze drying*) dan kriopreservasi (*cryopreservation/cryogenicpreservation*).

*Cryopreservasi* merupakan penggunaan temperatur yang rendah untuk menjaga agar sel atau jaringan hidup tetap kompak strukturnya. 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 *cryoprotectant* yang dapat mencegah terjadinya kristal es dalam sel. Syarat dari *cryoprotectant* ini adalah bahan harus sangat larut dalam air, dan tetap larut dalam air pada kondisi suhu dingin, bahan harus bisa melakukan penetrasi ke dalam sel dan bahan mempunyai toksisitas yang rendah sehingga bisa digunakan dalam konsentrasi tinggi.

Gliserol merupakan bahan preservasi yang memiliki daya larut yang tinggi dengan media cair *tryptone soya broth* (TSB), dimana pada kondisi suhu dingin, dapat memiliki daya penetrasi sampai ke dalam sel dan memiliki daya toksisitas yang rendah. Menurut 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, dengan demikian gliserol merupakan bahan preservasi yang baik untuk penyimpanan bakteri, namun belum ada referensi dosis yang baik dan efektif untuk preservasi bakteri *Edwardsiella tarda* dan *E. coli* pada suhu -20°C. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efektifitas konsentrasi gliserol pada preservasi bakteri *Edwardsiella tarda* dan *E. coli*.

## METODE PENELITIAN

### Prosedur Penelitian

Penelitian ini diawali dengan mempersiapkan semua peralatan dan bahan dan dilakukan sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan 2 faktor dan 3 taraf perlakuan, masing masing perlakuan memiliki 3 ulangan. Pengamatan dan sampling dilakukan pada hari ke-0, ke-7 ke-14, ke-21, ke-28, ke-35 dan hari ke- 42. Dua faktor yang dimaksud di atas adalah faktor A yaitu bakteri *Edwardsiella tarda*, faktor B yaitu

bakteri *E.coli* dan yang dimaksud dengan 3 taraf perlakuan ialah (1) konsentrasi gliserol 10%, (2) konsentrasi gliserol 15% dan (3) konsentrasi gliserol 20%.

### **Persiapan Inokulum**

Biakan bakteri *Edwardsiella tarda* dan *E.coli* diperoleh dari Balai Uji Standar Karantina Ikan (BUSKIPM) Jakarta. Inokulasi bakteri secara bertahap dilakukan sebagai berikut; hari ke-1, mengambil 2-3 loop masing-masing biakan *Edwardsiella tarda* dan *E.coli* dari agar miring TSA dan dikultur ke dalam 5 ml TSB, kemudian diinkubasikan pada suhu kamar selama 24 jam. Hari ke-2 (setelah 24 jam yang pertama), sebanyak 5 ml inokulum pada *test tube* tersebut, diambil dan dimasukkan ke dalam 100 ml TSB, kemudian diinkubasikan pada suhu ruang selama 24 jam. Selanjutnya, pada hari ke-3 dilakukan pengenceran sebanyak  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  dengan menggunakan larutan pengencer dan mengkulturkannya pada media *Tryptone Soya Agar* (TSA) selama 24 jam. Pada hari ke-4 diadakan penghitungan *total plate count* (TPC) sebagai perhitungan kepadatan awal.

Metode yang digunakan untuk menumbuhkan dan mendapatkan jumlah koloni adalah metode cawan tuang. Adapun prosedur metode cawan tuang (Cappucino and Natalie, 2001) adalah sebagai berikut, ambil 1 ml bakteri (dalam media *Tryptone Soya Broth*) dan diencerkan dalam 9 ml air steril ( $10^{-1}$ ), demikian pula pada pengenceran seri selanjutnya. Sebanyak 0,1 ml sampel dari pengenceran  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  diinokulasikan pada media TSA, kemudian disebar menggunakan *spreader*. Inkubasi ini dilakukan pada suhu 35°C selama 24 jam. Selanjutnya menghitung jumlah koloni yang tumbuh setelah 24 jam inkubasi. Perhitungan jumlah koloni yang tumbuh menggunakan koloni konter.

Penghitungan jumlah koloni sebagai total koloni bakteri *Edwardsiella tarda* atau *E. coli* memakai satuan CFU/ml. Uji utama dilakukan untuk menentukan pengaruh konsentrasi gliserol dengan lama penyimpanan.

Langkah berikutnya adalah menyiapkan *cryo tube* yang telah berisi 0,5 ml gliserol dengan konsentrasi gliserol 20%, 30% dan 40%, kemudian disterilisasi dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121 °C selama 15 menit. Sebanyak 0,5 ml isolat yang telah ditumbuhkan pada media TSB dimasukkan ke dalam masing-masing *cryo tube*. Volume akhir yang diperoleh pada masing-masing *cryo tube* adalah 1 ml sehingga akan diperoleh konsentrasi akhir gliserol 10%, 15% dan 20%.

Hasil tersebut berdasarkan pengenceran dengan perbandingan 1:1 (volume gliserol dan bakteri). Kemudian koleksi awetan tersebut dimasukkan ke tempat penyimpanan dengan suhu -20 °C dengan pengulangan sebanyak 3 kali. Analisis tingkat kelangsungan hidup dilakukan untuk menentukan secara kuantitatif koloni bakteri pada masing-masing konsentrasi gliserol setelah beberapa waktu penyimpanan.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Penelitian ini dilakukan untuk melihat viabilitas (tingkat kelangsungan hidup) *Edwardsiella tarda* dan *Escherchia colli* dengan preservasi gliserol dalam *Tryptic Soy Broth* (TSB) pada kondisi suhu -20°C dan waktu penyimpanan yang berbeda. *Edwardsiella tarda* dan *Escherchia colli* dipreservasi selama 42 (empat puluh dua) hari dan dipreservasi dengan konsentrasi gliserol yang berbeda yaitu 10%, 15%, dan 20%. Selama penelitian diperoleh data perhitungan *total plate count* (TPC) dan data tersebut sekaligus menunjukkan data parameter tumbuh atau tidak tumbuhnya. Penentuan kepadatan awal *Edwardsiella tarda* dan *E. coli* yang diinokulasi dalam media TSB pada suhu 35°C selama 48 jam (menggunakan metode TPC), didapatkan populasi sebesar  $1,14 \times 10^{10}$  CFU/ml untuk *Edwardsiella tarda* dan  $5,41 \times 10^8$  untuk *E. coli*. Kepadatan awal ini merupakan inokulum yang ditambahkan ke dalam seluruh perlakuan konsentrasi gliserol dengan perbandingan 1:1 (Kirsop, et al., 1991).

### **Kepadatan Bakteri Dan Viabilitas**

Kepadatan bakteri dalam penelitian ini dihitung secara tidak langsung. Perhitungan dengan metode jumlah koloni dilakukan untuk mengetahui jumlah bakteri yang hidup saja. Adapun hasil perhitungan kepadatan bakteri selama penelitian disajikan pada Tabel 1.

Berdasarkan hasil penelitian terlihat adanya perbedaan kepadatan bakteri pada setiap kali sampling. Data di atas menunjukkan adanya penurunan jumlah kepadatan bakteri selama preservasi. Penggunaan konsentrasi gliserol 10%, pada hari ke-7, untuk bakteri *Edwardsiella tarda* hidup sebanyak  $6,78 \times 10^9$ CFU/ml (59,47%) atau mengalami penurunan sebesar 40,53%, sedangkan untuk bakteri *E. coli* hidup sebanyak  $5,24 \times 10^8$  (97%) atau mengalami penurunan sebesar 3%. Selanjutnya, pada hari ke- 14 kepadatan bakteri *Edwardsiella tarda* mengalami penurunan kembali sebanyak sebesar 82,23% dari jumlah kepadatan

awal yaitu dengan kepadatan  $2,02 \times 10^9$  CFU/ml, sedangkan untuk bakteri *E.coli* mengalami penurunan sebesar 4,4 % dari jumlah kepadatan awal yaitu dengan kepadatan  $5,17 \times 10^8$  CFU/ml. Pengamatan terakhir pada konsentrasi gliserol 10% yaitu pada hari ke-42, dimana kepadatan bakteri *Edwarsiella tarda* sebanyak  $2,09 \times 10^8$  CFU/ml (1.83%) atau mengalami penurunan yang sangat drastis mulai pengamatan hari ke-7 sampai akhir penelitian yaitu sebesar 98,17%, sedangkan untuk bakteri *E. coli* yang masih bertahan hidup adalah sebanyak  $4,32 \times 10^8$  CFU/ml (80%) atau hanya mengalami penurunan sebesar 20%.

Bakteri yang dipreservasi dengan gliserol 15% pada hari ke-7, untuk bakteri *Edwarsiella tarda* juga mengalami penurunan sebesar 48,53% dan yang masih bertahan hidup sebanyak  $5,92 \times 10^9$  CFU/ml (51,47%), sedangkan untuk bakteri *E. coli* juga mengalami penurunan sebesar 2% dan yang bertahan hidup adalah sebanyak  $5,3 \times 10^8$  CFU/ml (98%). Kemudian pada hari ke- 14 kepadatan bakteri *Edwarsiella tarda* sebesar  $1,31 \times 10^9$  CFU/ml (11,49%) dan mengalami penurunan yang sangat drastis sebesar 88,51%, sedangkan bakteri *E. coli* mengalami penurunan hanya sebesar 5% atau yang masih bertahan hidup sebanyak  $5,3 \times 10^8$  (95%). Pada hari ke-42 kepadatan bakteri *Edwarsiella tarda* sebanyak  $6,33 \times 10^7$  CFU/ml (0,55%), sedangkan bakteri *E. coli* yang bertahan hidup adalah sebanyak  $4,5 \times 10^8$  CFU/ml atau hanya mengalami penurunan sebesar 16%.

Berdasarkan data tersebut didapatkan bahwa terjadi penurunan jumlah kepadatan bakteri *Edwarsiella tarda* yang signifikan namun tidak signifikan pada bakteri *E. coli*. Penurunan itu terjadi karena terhentinya proses metabolisme tanpa diimbangi dengan penambahan sel. Berdasarkan data di atas konsentrasi 15 % ini sudah cukup baik untuk mempertahankan jumlah kepadatan bakteri *E.coli* selama 42 hari. Sedangkan untuk *Edwarsiella tarda* konsentrasi yang cukup baik untuk preservasi adalah konsentrasi gliserol sebanyak 10 %, sedangkan pada konsentrasi gliserol yang lebih

tinggi koloni bakteri *Edwarsiella tarda* tidak dapat tumbuh dengan baik (lambat), dimana konsentrasi gliserol yang tinggi dapat menghambat metabolisme sel dan sel akan mati.

Dari penelitian ini dapat dilihat bahwa selama preservasi, terjadi kematian bakteri, namun kondisi ini tidak terjadi secara total namun secara perlahan selama proses penyimpanan berlangsung. Hal lain yang mungkin menjadi penyebab turunnya populasi bakteri adalah karena adanya kejutan suhu yang cepat pada proses penyimpanan di dalam freezer.

Seperti halnya dengan daya tumbuh bakteri, tinggi rendahnya populasi bakteri juga dipengaruhi oleh proses difusi/osmosa yang terjadi antara cryoprotectant dengan sitoplasma. Pada bakteri yang dipreservasi dengan gliserol 10% proses difusi/osmosa tidak dapat berjalan dengan baik sehingga banyak bakteri yang rusak/mati menyebabkan daya tumbuh bakteri menjadi relatif rendah, sehingga kepadatan bakteri yang dihasilkan juga rendah. Sebaliknya pada bakteri yang dipreservasi dengan gliserol 15% dan 20%, proses difusi/osmosa dapat berjalan dengan lebih baik sehingga proses penyimpanan bakteri dapat berlangsung lebih baik. Akibatnya daya tumbuh bakteri serta populasi bakteri yang dihasilkan dari biakan ini lebih tinggi daripada bakteri yang dipreservasi dengan gliserol 10%. Hal ini sesuai dengan pendapat Ryan (2007) yang menyatakan bahwa gliserol merupakan bahan preservasi yang baik, tetapi dapat menyebabkan problem yang berkaitan dengan tekanan osmotik. Pada hasil penelitian ini diketahui bahwa gliserol dengan konsentrasi 15% dan 20 % merupakan konsentrasi yang paling efektif untuk menyimpan biakan *E.coli* pada suhu  $-20^\circ\text{C}$ . Sedangkan untuk *Edwarsiella tarda* konsentrasi gliserol yang paling efektif adalah 10 % karena perbedaan dinding sel bakteri *Edwarsiella tarda* dan pertumbuhan yang lambat dari *Edwarsiella tarda* dibanding golongan enterobacteriaceae lainnya.

Viabilitas bakteri berhubungan dengan kepadatan dan daya tumbuh bakteri, jika kepadatan dan daya tumbuh bakteri tinggi maka viabilitas

Tabel 1. Total Plate Count (TPC) dan viabilitas (V) bakteri *E. coli* dan *E. tarda* selama 42 hari. (Gl: gliserol)

WP Hari	<i>E. Coli</i>						<i>E.Tarda</i>					
	Gl 10%	V (%)	Gl 15%	V (%)	Gl 20%	V (%)	Gl 10%	V (%)	Gl 15%	V (%)	Gl 20%	V (%)
0	$1,14 \times 10^{10}$	-	$1,14 \times 10^{10}$	-	$1,14 \times 10^{10}$	-	$5,41 \times 10^8$	-	$5,41 \times 10^8$	-	$5,41 \times 10^8$	-
7	$6,78 \times 10^9$	59,5	$5,92 \times 10^9$	51,5	$6,02 \times 10^9$	52,8	$5,24 \times 10^8$	97,0	$5,3 \times 10^8$	98,0	$5,27 \times 10^8$	97,5
14	$2,02 \times 10^9$	17,8	$1,31 \times 10^9$	11,5	$1,08 \times 10^9$	9,5	$5,17 \times 10^8$	95,6	$5,13 \times 10^8$	95,0	$5,12 \times 10^8$	94,7
21	$7,78 \times 10^8$	6,82	$9,02 \times 10^8$	7,9	$7,25 \times 10^8$	6,4	$5,07 \times 10^8$	93,8	$5,1 \times 10^8$	94,2	$5,04 \times 10^8$	93,2
28	$5,50 \times 10^8$	4,82	$8,40 \times 10^8$	7,4	$6,06 \times 10^8$	5,3	$4,81 \times 10^8$	89,0	$4,92 \times 10^8$	92,0	$4,86 \times 10^8$	90,0
35	$3,65 \times 10^8$	3,20	$3,80 \times 10^8$	3,3	$2,99 \times 10^8$	2,6	$4,62 \times 10^8$	85,4	$4,76 \times 10^8$	87,9	$4,54 \times 10^8$	84,0
42	$2,09 \times 10^8$	1,83	$6,33 \times 10^7$	0,6	$1,49 \times 10^8$	1,3	$4,32 \times 10^8$	80,0	$4,5 \times 10^8$	84,0	$4,49 \times 10^8$	82,5

selama preservasi bisa dipertahankan. Viabilitas bakteri pada hari ke-7 untuk bakteri *Edwardsiella tarda* mengalami penurunan yang signifikan pada semua konsentrasi namun untuk *E. coli* tidak mengalami penurunan yang signifikan dan cenderung mengalami penurunan yang stabil pada semua konsentrasi. Penurunan ini terjadi disebabkan kemungkinan adanya kejutan suhu yang menyebabkan proses pengkristalan air di dalam sel dan kemudian menyebabkan kerusakan pada sel. Kondisi ini terjadi karena pada saat preservasi untuk pertama sekali tidak dilakukan proses adaptasi suhu secara bertahap, maka gliserol sebagai bahan preservasi yang diharapkan dapat melindungi sel dari kerusakan tidak bisa memasuki sel secara sempurna. Hal ini sesuai dengan pendapat Herdis *et al.* (2003) yang menyatakan bahwa gliserol mampu mencegah pengumpulan molekul-molekul air dan kristalisasi es pada titik beku larutan, gliserol akan memodifikasi kristal es yang terbentuk di dalam medium pembekuan sehingga menghambat kerusakan sel secara mekanis.

Selanjutnya pada hari ke-28, terjadi penurunan persentase viabilitas bakteri *Edwardsiella tarda* namun tidak signifikan pada hari ke-7 hal ini terjadi karena proses adaptasi telah berlangsung dengan baik. Selanjutnya pada pengamatan hari ke-42 terus terjadi penurunan, hal ini menunjukkan bahwa laju kematian sangat besar dan menunjukkan bahwa penggunaan suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  belum optimal menghentikan proses penuaan/metabolisme secara total pada bakteri.

Data di atas menunjukkan bahwa semakin lama waktu preservasi maka persentase viabilitas bakteri semakin menurun. Hal ini erat kaitannya dengan daya tumbuh bakteri yang dipengaruhi oleh faktor lingkungan, terutama suhu dan medium, sesuai dengan pendapat Capucino and Natalie (2001) yang menyatakan bahwa viabilitas (tingkat kelangsungan hidup) bakteri dipengaruhi oleh daya tumbuh bakteri, medium, suhu, pH dan nutrisi. Kondisi lingkungan yang tidak optimal untuk pertumbuhan bakteri yaitu dengan suhu rendah ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) menyebabkan sel tidak dapat bekerja untuk melanjutkan kehidupan namun dengan suhu tersebut belum optimal menghentikan proses metabolisme bakteri secara total.

Viabilitas dari bakteri yang dipreservasi dengan gliserol 15% dan 20% pada *E. coli* yaitu sekitar 84 % dan *Edwardsiella tarda* sekitar 1,83 % sampai hari ke 42. Metode preservasi menghasilkan tingkat pemulihan yang berbeda-beda, tergantung pada spesies bakteri yang dipreservasi. Sampai dengan saat ini tidak ada metode yang bisa menyimpan seluruh jenis bakteri dengan baik

sehingga untuk satu jenis bakteri perlu disimpan pada berbagai metode preservasi. Hal ini sesuai dengan pendapat Gorman and Adley (2004), yang menyatakan bahwa gliserol 50% dengan penyimpanan suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  kurang tepat untuk menyimpan biakan bakteri karena kurang dingin. Viabilitas yang rendah juga dijumpai pada *Campylobacter jejuni* yang dipreservasi dengan gliserol 50% pada *Nutrient Broth*. Dalam waktu 1 bulan diperoleh pemulihan bakteri sebesar 80%, 2 bulan dengan pemulihan 40%, 3 bulan dengan pemulihan 40% dan 6 bulan dengan pemulihan 0% (mati semua).

Sesuai dengan pendapat Hollander and Nell dalam Howard (1995) yang mengatakan bahwa keberadaan 15% gliserol mampu melindungi *E. coli*, *Diplococcus pneumoniae* dan *Treponema pallidum* dari kerusakan pada selama pembekuan pada suhu  $-70^{\circ}\text{C}$  selama 2 bulan penyimpanan tanpa kehilangan sifat virulensi. Menurut Howard (1995) bahwa bakteri *Aerobacter aerogenes*, *Corynebacterium difteriae*, *Corynebacterium xerose*, *Corynebacterium pseudodipteriticum*, *Diplococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Micrococcus pyogenez var. aureus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Serratia marcescens*, *Shigella flexneri* dan *Streptococcus viridans* yang dipreservasi dengan gliserol konsentrasi 15% yang tersuspensi dalam *alibi brucela broth* dan disimpan pada suhu  $-10^{\circ}\text{C}$ , dapat menunjukkan kemampuan viabilitas selama 5 bulan.

Berdasarkan uji statistik analisis variansi (ANAVA), didapat F hitung baik untuk *Edwardsiella tarda* maupun untuk *E. coli* lebih besar dari  $F_{\text{Tabel}}$  dengan tingkat kepercayaan 95%. Dari hasil uji Statistika ini diketahui bahwa terdapat perbedaan yang sangat nyata pada viabilitas bakteri *Edwardsiella tarda* dan *E. coli* yang dipreservasi dengan berbagai konsentrasi gliserol dalam TSB pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  dengan waktu yang berbeda.

## KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan, bahwa persentase viabilitas bakteri *E. coli* yang tertinggi selama preservasi diperoleh dengan penggunaan gliserol konsentrasi 15% dengan jumlah kepadatan bakteri sebanyak 84%, dan yang terendah adalah dengan penggunaan konsentrasi 10% dengan kepadatan bakteri sebanyak 80%; sedangkan untuk *Edwardsiella tarda* persentase viabilitas bakteri yang tertinggi selama preservasi diperoleh dengan penggunaan gliserol konsentrasi 10% dengan

jumlah kepadatan sebesar 1,83% dan yang terendah adalah dengan penggunaan konsentrasi 15% yakni dengan jumlah kepadatan sebesar 0,55%. Perbedaan konsentrasi gliserol yang optimal untuk penyimpanan bakteri ini disebabkan karena perbedaan dinding bakteri yang mempengaruhi tekanan osmotik media *crioprotectant* yang digunakan.

## REFERENSI

- CAPPUCINO, J.G. and NATALIE, S. (2001) *Microbiology a laboratory Manual*. Sixth Edition. Benjamin Cumming. USA: San Francisco.
- GORMAN, R and ADLEY, C.C. (2004) *An Evaluattion of Five Preservation techniques and Conventional Freezing Temperatures of 20°C and -85°C For Long -Term Preservation of Campylobacter jejuni*. Microbiology Laboratory, Department of Chemical and Sciences, University of Limerick. Ireland: Limerick.
- HERDIS, K.I., SURACHMAN, M. and SUHANA, R.E. (2003) Optimalisasi Kualitas Semen Beku Domba Garut dengan Pemberian Gliserol. *Prosiding Seminar Teknologi untuk Negeri*, Vol II, pp. 17-23.
- HOWARD, D.H. (1995) The Preservation of Bacteria by Freezing in glycerol Broth. *Journal of Microbiology*, p. 1.
- KEPMEN KP (2010) *Penetapan Jenis- jenis Hama dan Penyakit Ikan karantina Golongan, media Pembawa dan Sebarannya*. Keputusan Menteri No.03/ MEN/2010.
- KIRSOP, et al. (1991) *Maintenance of Micro-organism and Cultured Cells*. A Manual of Laboratory Methods. Second Edition. Academic Press.
- RYAN, J.A. (2007) *Cryogenic Preservation and Storage of Animal Cells*. Corning Incorporated Live Sciences 45 Nagog Park Acton, MA 01720.
- YUASA, et.al. (2003) *Panduan Diagnosa Penyakit Ikan. Teknik Diagnosa Penyakit Ikan Budidaya Air Tawar di Indonesia*. Jambi: Balai Budidaya Air Tawar Jambi dan Japan International Cooperation Agency.

Diterima: 30 September 2013

Disetujui: 30 Oktober 2013