

**ASSAY OF *Acinetobacter* AS COMPETITOR TO VIBRIOSIS
LUMINESCENCE BACTERIA IN PACIFIC PACIFIC WHITE
SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*)**

Assovaria¹ · Esti Harpeni¹ · Asep Saefulloh²

Ringkasan Pacific white shrimp culture is having problems caused by bacteria infection. The cause of bacteria infection is *V. harveyi*, it can decrease seed production. Pathogenicity of vibriosis can decrease with inhibition by other types of bacteria. The aim of the research was to get competitor *V. harveyi* isolates through identification and challenge test in vitro and in vivo. The result of screening of bacterial isolates were obtained from cultivation supplement products to produced 4 pure isolates with different morphologically colonies and cells. There was one potential isolate could inhibits *V. harveyi* by inhibition test in vitro. Biochemical test from three different laboratories were identified that *Acinetobacter* sp. as competitor to *V. harveyi* and it was not pathogenic to Pacific white shrimp. Challenge test *Acinetobacter* sp. against *V. harveyi* on Pacific white shrimp larvae was conducted through three treatments, without given *V. harveyi* and *Acinetobacter* sp. As controls; treatment with given bacteria *V. harveyi* and treatment with given *V. harveyi* and *Acinetobacter* sp. The challenge test results showed that treatment with given of *V. harveyi* and *Acinetobacter* sp. may decreased *V. harveyi* density of 6.3×10^6

CFU/mL to 7.5×10^3 CFU/mL which could suspected to decrease pathogenicity of competition number of colonies.

Keywords Pacific white shrimp, luminescence bacteria, vibriosis, *Acinetobacter*, competition

Received: 24 Februari 2015

Accepted: 17 Mei 2015

PENDAHULUAN

Kegiatan budidaya udang vannamei (*Litopenaeus vannamei*) menghadapi kendala berupa infeksi penyakit bakterial terutama pada tahap pemeliharaan larva di panti benih. Salah satunya adalah penyakit bakterial yang disebabkan oleh *V. harveyi* yang infeksinya dicirikan dengan tubuh udang berpendar di malam hari dan mengakibatkan kematian udang sampai >80 % dari populasi (Sukenda et al., 2009, 2007). *V. harveyi* menginfeksi larva udang pada saat udang berganti kulit atau pengaruh kualitas air yang buruk (Nasi et al., 2011) karena sistem imun udang belum ter-

¹) Department of Aquaculture Faculty of Agriculture University of Lampung Jl. Prof. Soemantri Brodjonegoro No. 1 Gedong Meneng, Bandar Lampung 35145²) Marine Research Center of PT. CentralPertiwi Bahari E-mail: edype-ni@yahoo.com

bentuk untuk menahan toksin yang dikeluarkan oleh patogen.

Pencegahan penyakit bakterial pada udang vannamei dapat dilakukan meningkatkan imunitas dengan penambahan bahan nutrisi tertentu pada pakan, immunostimulan, dan pemberian suplemen. Suplemen ini merupakan cairan yang mengandung berbagai bakteri. Studi kasus mengenai identifikasi dan pemanfaatan bakteri yang hidup pada suplemen masih belum banyak dilakukan. Suplemen ini ditengarai memiliki potensi sebagai probiotik, sehingga penelitian ini perlu dilakukan untuk membuktikan potensi tersebut. Isolat tersebut diharapkan dapat diaplikasikan dalam budidaya udang vannamei terutama pada tahap pembenihan yang sangat rentan terinfeksi penyakit.

MATERI DAN METODE

Penelitian dilaksanakan pada Mei sampai Oktober 2014, di *Marine Research Center* (MRC) PT. CentralPertiwi Bahari (CPB), di Suak Sidomulyo Kabupaten Lampung Selatan. Tahapan yang dilakukan pada penelitian ini adalah penapisan, identifikasi bakteri penghambat *V. harveyi* dengan morfologi - biokimia, uji patogenitas bakteri penghambat *V. harveyi* dan uji tantang bakteri penghambat *V. harveyi* pada larva udang vannamei dengan indikator kepadatan bakteri dan tingkat kelangsungan hidup (%).

Alat yang digunakan pada studi ini antara lain cawan petri, spreader, jarum ose, bunsen, mikro pipet, tip, paper disk, eppendorf, autoklaf, oven, inkubator, *laminar air flow*, tabung reaksi, beaker glass, vortex, hot plate stirer, timbangan digital, aluminium foil, masker, sarung tangan, selang aerasi, batu aerasi, bak fiber, baskom, pipet plastik, mikro pipet, wadah kultur artemia 1,5 liter, gelas ukur 100 mL. Bahan yang digunakan pada studi ini antara lain suplemen udang media Luria Bertani Agar, media *Tryptone Soy Broth Oxoid*, alkohol 70% dan 96%, Isolat *Vibrio harveyi*, KOH 3%, H₂O₂ 3%, *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA) *Oxoid*, *Simmon's citrate* BBLTM, larutan garam fisiologis 0,85%, larva udang vannamei PL 1, isolat *Acinetobacter* sp., *Artemia* sp., pakan CP 01, algae (*Chaetoceros* sp.) dan media *Thio-sulfate Citrate Bile Sucrose* (TCBS).

Sampel suplemen diisolasi pada media LBA dengan menggunakan pengenceran 100, 10⁻¹, dan 10⁻². Sebanyak 100 µl sampel suplemen dari tiap pengenceran disebar pada media LBA lalu diinkubasi selama 24 jam. Setelah diinkubasi koloni bakteri diamati morfologi awalnya meliputi bentuk, warna, dan tepi. Bakteri dengan morfologi yang berbeda kemudian diisolasi dan dimurnikan. Masing – masing sebanyak 1 ose isolate bakteri dan isolat *V. harveyi* disuspensikan kedalam 500µl NaCl 0,85% steril di dalam tabung *eppendorf*. Se-

lanjutnya sebanyak 50 µl suspensi *V. harveyi* disebar pada media LBA dan dibiarkan sampai kering. Paper dengan diameter 5 mm diletakkan di atas media LBA yang telah ditebarkan *V. harveyi* dan kemudian sebanyak 5 µl suspensi isolate bakteri suplemen diteteskan ke atas paper disk tersebut. Setelah diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam, zona hambat yang terbentuk diamati dan diukur diameternya (Widanarni et al., 2008).

Identifikasi bakteri dilakukan secara konvensional melalui pengamatan morfologi dan uji biokimia meliputi uji Gram dengan KOH 3%, uji Katalase, uji Oksidatif Fermentatif, uji *Methyl Red* (MR), uji *Simmon's Citrate*, uji TSIA, dan uji Motilitas. Identifikasi dilakukan berdasarkan acuan metode *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology* (Holtj and Krieg, 1984). Penilaian berdasarkan kecocokan yang paling tinggi atau mendekati 100%. Uji perbandingan identifikasi isolat dilakukan dengan mengirim sampel ke Balai Veteriner Lampung dan Stasiun Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Kelas 1 Lampung.

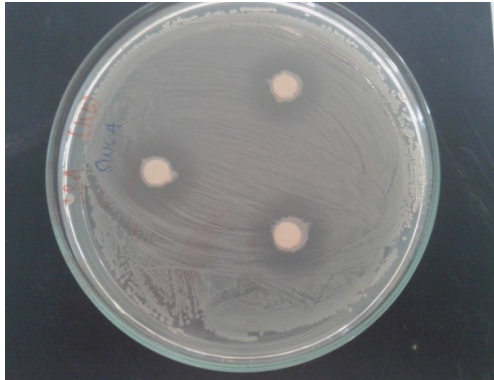
Isolat bakteri penghambat diinokulasi ke media TSB kemudian diinkubasi pada shaker dengan suhu ruangan 30–31°C selama 16–18 jam. Pengujian dilakukan dengan menambahkan *suspense isolate* bakteri suplemen berkonsentrasi 10⁴, 10⁶ dan 10⁸ CFU/mL pada media pemelihan

raan larva udang. Larva udang dipelihara dalam wadah dengan volume 3 liter, yang diisi dengan 2 liter air laut dengan kepadatan udang vanamei 125 ekor/L dan diberi pakan *Chaetoceros* sp., *Artemia* sp. dan pakan buatan CP 01. Frekuensi pemberian pakan sebanyak 3 kali/hari. Pemeliharaan larva udang dilakukan selama 7 hari. Pada akhir pemeliharaan kelangsungan hidup larva udang vanamei dihitung dan dibandingkan dengan kontrol, yakni perlakuan tanpa penambahan isolat bakteri yang mampu menghambat pertumbuhan *V. harveyi* (Widanarni et al., 2008). Parameter yang diamati adalah kelangsungan hidup dan *Total Vibrio Count* (TVC). Pengamatan dilakukan menggunakan media TCBS untuk melihat kepadatan bakteri *V. harveyi* pada pemeliharaan. Kelangsungan hidup diamati pada akhir percobaan dan TVC diamati setiap hari.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penapisan isolat bakteri berhasil memperoleh 19 koloni bakteri yang tumbuh pada media Luria Bertani. Setelah pemurnian isolat, 4 isolat diperoleh berdasarkan uji morfologi yang berbeda. Keempat koloni bakteri hasil isolasi kemudian diuji daya hambatnya secara *in vitro* untuk mendapatkan isolat bakteri yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi*.

Terdapat satu isolat bakteri yang mampu menghambat *V. harveyi* de-



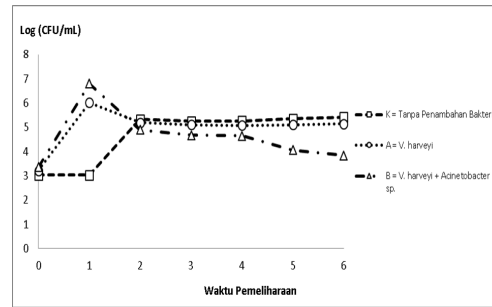
Gambar 1 Hasil uji aktivitas penghambatan *V. harveyi* oleh *Acinetobacter* sp

Tabel 1 Hasil uji morfologi dan biokimia bakteri penghambat *V. harveyi*

Jenis Pengujian	Hasil Pengujian
Morfologi Sel	
- Bentuk	Coccus
- Gram	-
Katalase	+
O/F	Fermentatif
TSIA	Non - reaksi
Simmon's Citrate	+
Methyl Red	-
Motilitas	-

ngan pembentukan zona hambat di sekitar paper disk diantara isolat (Gambar 1). Penghambatan pertumbuhan bakteri *V. harveyi* disebabkan oleh senyawa aktif antibakteri yang dihasilkan oleh bakteri penghambat (Sukenda et al., 2007). Senyawa antibakteri dapat dikeluarkan secara perlahan dan terus-menerus ke lingkungan sekitar untuk menghindari pesaing yang ada di lingkungan tersebut (Abraham, 2004).

Isolat bakteri penghambat diidentifikasi secara morfologi dan biokimiawi (Tabel 1) menunjukkan bahwa isolat tersebut termasuk dalam genus *Acinetobacter*. Secara morfologi bakteri tersebut berbentuk *co-*

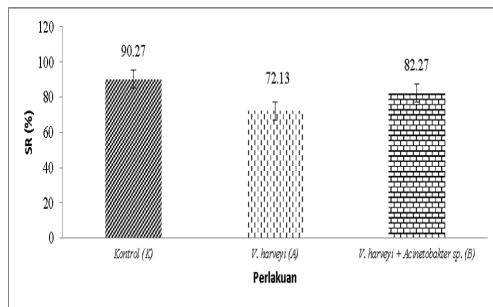


Gambar 2 Kepadatan *V. harveyi* yang menurun signifikan dengan penambahan *Acinetobacter* sp

cus dan tergolong kedalam bakteri Gram negatif, kemudian uji biokimia menunjukkan bahwa bakteri tersebut bersifat fermentatif, motil, serta menunjukkan hasil positif pada uji katalase. Pengujian biokimia juga dilakukan pada dua institusi yang kompeten dan menunjukkan hasil yang sama bahwa isolat bakteri penghambat adalah *Acinetobacter*. Genus *Acinetobacter* sp. tergolong kedalam bakteri Gram negatif yang sebagian besar berpotensi sebagai patogen pada udang. Untuk itu dilakukan uji patogenisitas dengan melihat tingkat kelangsungan hidup.

Uji patogenisitas menggunakan perbandingan antara larva udang yang ditambahkan bakteri penghambat dan tanpa bakteri penghambat. Hasil menunjukkan penambahan isolat bakteri penghambat dan tanpa penambahan bakteri penghambat tidak menyebabkan kematian pada larva udang vannamei. Hasil ini menunjukkan bahwa isolat bakteri suplemen tersebut tidak berpotensi patogen (Tabel 2).

Kepadatan *V. harveyi* pada hari ke-0 merupakan kepadatan *V. ha-*



Gambar 3 Tingkat kelangsungan hidup (%) udang vannamei (*L. vannamei*) pada uji tantangan yang menunjukkan kenaikan dengan penambahan *Acinetobacter* sp

rveyi di air pemeliharaan sebelum perlakuan. Kepadatan *V. harveyi* pada air kontrol adalah $1,28 \times 10^3$ CFU/mL; pada perlakuan A $2,13 \times 10^3$ CFU/mL dan perlakuan B $1,03 \times 10^3$ CFU/mL. Setelah isolat bakteri suplemen ditambahkan pada perlakuan B, kepadatannya meningkat hingga 3 log (Gambar 2), sedangkan kepadatan bakteri pada kontrol cenderung tetap. Pada hari ke-2 kepadatan *V. harveyi* pada semua perlakuan berada pada kisaran $1,08 \times 10^6 - 6,32 \times 10^6$ CFU/mL. Pada hari selanjutnya kepadatan bakteri pada perlakuan B cenderung mengalami penurunan sebanyak 2 log (dari 10^5 ke 10^3 CFU/mL). Hasil ini menunjukkan bahwa penambahan isolat bakteri suplemen mampu menurunkan kepadatan *V. harveyi*. Penurunan kepadatan *V. harveyi* oleh bakteri suplemen kemungkinan disebabkan oleh adanya senyawa inhibitor yang dihasilkan bakteri, sehingga dapat menurunkan bakteri merugikan (Rengpipat, 1998).

Tingkat kelangsungan hidup udang vannamei pada uji tantangan diperoleh

Tabel 2 Tingkat kelangsungan hidup udang vannamei pada saat uji patogenisitas

Bakteri	Kepadatan (CFU/mL)	Populasi (ekor)	SR (%)
<i>Acinetobacter</i> sp.	104	250	100
	106	250	100
	108	250	100
Kontrol (tanpa bakteri)	0	250	100

hasil tertinggi pada perlakuan tanpa penambahan *V. harveyi* (kontrol) yaitu 90,27%, kemudian untuk perlakuan penambahan *V. harveyi* dan *Acinetobacter* sp. yaitu 82,27% serta untuk perlakuan penambahan *V. harveyi* saja yaitu 72,13% (Gambar 3). Dengan demikian, isolat *Acinetobacter* sp. mampu menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi* sehingga meningkatkan kelangsungan hidup pada udang vannamei (Fjellheim et al., 2007).

SIMPULAN

Acinetobacter sp. mampu menghambat pertumbuhan *V. harveyi*, tidak bersifat patogen dan mampu meningkatkan kelangsungan hidup udang vannamei.

Abraham, T. J. (2004). Antibacteria marine bacterium deter luminous vibriosis in shrimp larvae. Technical report, NAGA. Fjellheim, A. J., Playfoot, K. J., Skjermo, J., and Vadstein, O. (2007). Vibrionaceae dominates the microflora antagonistic towards listonella anguillarum in the intestine of cultured atlantic cod (gadus morhua l.) larvae. *Aquaculture*, 269:98–106.

Holtj, G. and Krieg, N. R. (1984). *Bergeys Manual of Systemic Bacteriology*. Williams and Wilkins, 1 edition.

- Nasi, L., Prayitno, S. B., and Sarjito (2011). Kajian bakteri penyebab vibriosis pada udang secara biomolekuler. Master's thesis, Universitas Diponegoro.
- Rengpipat, S. (1998). Effect of probiotic bacterium on black tiger shrimp *penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture*, 167:303–313.
- Sukenda, Anggoro, Y. T., Wahyuningrum, D., and Rahman (2007). Penggunaan kitosan untuk pengendalian infeksi *v. harveyi* pada udang putih (*litopenaeus vannamei*). *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 6:205–209.
- Sukenda, S., Dwinanti, H., and Yuhana, M. (2009). Keberadaan white spot syndrome virus (wssv); taura syndrome virus (tsv); infectious hypodermal haematopoietic necrosis virus (ihnv) di tambak intensif udang vaname (*litopenaeus vannamei*) bakauheni, lampung selatan. Master's thesis, Institut Pertanian Bogor.
- Widanarni, Sukenda, and Setiawati, M. (2008). Bakteri probiotik dalam budidaya udang : Seleksi, mekanisme, karakteristik, dan aplikasinya sebagai agen biokontrol. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 3:80–89.