IDENTIFIKASI BAKTERI PADA LARVA IKAN TUNA SIRIP KUNING (*Thunnus albacares*)

Indah Mastuti^a, Ananto Setiadi^a, Des Roza^a, dan Ketut Mahardika^a

^aBalai Besar Riset Budidaya Laut dan Penyuluhan Perikanan, Desa Penyabangan, Kec. Gerokgak, Kab. Buleleng, Bali, Indonesia

* Koresponden penulis : kmahardika@yahoo.com

Abstrak

Perbenihan tuna sirip kuning (*Thunnus albacares*) telah dilakukan sejak tahun 2015 di Balai Besar Riset Budidaya Laut dan Penyuluhan Perikanan, Gondol, Bali. Akan tetapi, dalam perbenihan tuna sirip kuning masih dihadapkan adanya tingkat kematian yang tinggi pada tahap larva. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi bakteri pada perbenihan larva tuna sirip kuning. Bakteri diisolasi dari larva umur 5, 10, 15, 20 hari setelah menetas pada media marine agar. Koloni bakteri yang tumbuh direisolasi berdasarkan morfologinya. Setiap isolat diidentifikasi secara molekuler berdasarkan urutan nukleotida dalam gen ribosom 16S menggunakan pasangan primer 27F dan 1492R. Kesamaan masing-masing urutan nukleotida dianalisis dengan BLAST. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ditemukan 9 isolat bakteri dari larva ikan tuna sirip kuning yang tumbuh dengan morfologi berbeda. Hasil Analisa BLAST, bakteri tersebut memiliki kemiripan dengan *Bacillus cereus*, *B. methylotrophicus*, *B. amyloliquefaciens*, *Pseudomonas plecoglossicida*, *P. putida* dan *Vibrio* sp. strain voc. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi informasi awal tentang bakteri yang ada pada larva ikan tuna sirip kuning.

Kata Kunci: *Thunnus albacares*, larva, bakteri

Abstract

The seed of yellow fin tuna (*Thunnus albacares*) has been carried out since 2015 at the Institute for Mariculture Research and Fisheries Extension, Gondol-Bali. However, in the seed of yellow fin tuna was still faced with a high mortality rate at the larval stage. This study aims to identify bacteria in the seedlings of yellow fin tuna larvae. Bacteria were isolated from larvae aged 5, 10, 15, 20 days after hatching using marine agar media. Bacterial colonies that grew were isolated based on their morphology. Each isolate was identified molecularly based on nucleotide sequences in the 16S ribosome gene using 27F and 1492R primary pairs. The similarity of each nucleotide sequence was analyzed by BLAST. The results showed that 9 bacterial isolates were found from yellow fin tuna larvae that grew with different morphologies. BLAST Analysis results showed that the bacteria were similar to *Bacillus cereus*, *B. methylotrophicus*, *B. amyloliquefaciens*, *Pseudomonas plecoglossicida*, *P. putida* and *Vibrio* sp. voc strain. The results of this study are expected to be preliminary information about bacteria in yellow fin tuna larvae.

Keywords: *Thunnus albacares*, larvae, bacteria

PENDAHULUAN

Ikan tuna sirip kuning (*Thunnus albacares*) merupakan salah satu komoditas penting di pasar dunia yang produksinya masih didominasi dari hasil tangkapan [1]. Budidaya ikan tuna di Indonesia telah dimulai sejak tahun 2003 di Balai Besar Riset Budidaya Laut dan Penyuluhan Perikanan, Gondol-Bali. Berbagai aspek biologi induk tuna sirip kuning dalam mendukung upaya budidaya telah dipelajari seperti teknik penanganan

induk, pengamatan ukuran optimum calon induk tuna sirip kuning, teknik pembesaran calon induk dalam bak beton, pengamatan perkembangan gonad dan perkembangan embrio ikan tuna sirip kuning [2, 3, 4, 5, 6, 7].

Sejak tahun 2015, induk ikan tuna sirip kuning telah berhasil memijah secara alami di keramba jaring apung. Telur yang dihasilkan telah berhasil dibenihkan untuk menghasilkan juvenil ikan tuna sirip kuning. Akan tetapi, sintasan yang dihasilkan masih sangat rendah. Mortalitas benih ikan tuna lebih banyak

Article history:

Diterima / Received 18-02-2019

Disetujui / Accepted 20-11-2019

Diterbitkan / Published 30-04-2020

©2020 at <http://jfmr.ub.ac.id>

disebabkan oleh kualitas telur, tingkat kanibalisme yang tinggi dan kebiasaan ikan menabrak dinding bak atau lompat keluar bak [8, 9]. Walaupun mortalitas benih ikan tuna lebih disebabkan oleh faktor teknis dan biologi ikan tersebut, namun kemungkinan adanya faktor mikroorganisme patogen perlu juga mendapat perhatian serius.

Secara umum, salah satu faktor yang dapat mempengaruhi kelulushidupan larva ikan adalah komposisi mikroba. Dalam lingkungan akuatik ikan sangat mudah terpapar oleh mikrobiota termasuk bakteri. Bakteri merupakan mikrobiota yang menjadi mikroflora normal bahkan sejak awal benih ikan menetas. Mikroba dapat berpotensi sebagai patogen pada larva jika kondisi lingkungan yang tidak stabil atau tidak baik sehingga larva menjadi stress [10]. Beberapa jenis penyakit yang dilaporkan menyerang ikan tuna seperti infeksi cacing insang (*Cardicola ahi* atau *C. Fosteri*), infeksi lintah (*Caligididae* sp.) dan infeksi herpesvirus [11], infeksi endoparasit (*Ichthyodinium* sp.) pada embryo telur tuna [12]. Eksplorasi awal mengenai mikroorganisme yang berada di lingkungan pemeliharaan larva ikan tuna sirip kuning sangat perlu dilakukan. Oleh karena itu, dilakukan penelitian untuk mengetahui mikroflora pada larva tuna melalui identifikasi jenis bakteri dominan pada larva ikan tuna. Informasi awal ini diharapkan dapat mendukung teknologi pembenihan ikan tuna dengan studi lebih lanjut mengenai potensi mikroba tersebut terhadap perkembangan larva ikan tuna.

MATERI DAN METODE

Sampel larva ikan tuna sirip kuning

Larva ikan tuna diperoleh dari pembenihan di hatchery tuna di Balai Besar Riset Budidaya Laut dan Penyuluhan Perikanan, Gondol-Bali. Pengambilan sampel dilakukan pada saat larva berumur 5, 10, 15 dan 20 hari setelah menetas. Sampel ikan yang terlihat lemah dipilih untuk memperoleh kemungkinan mendapatkan bakteri yang bersifat patogen.

Isolasi bakteri larva tuna

Setiap sampel larva tuna sirip kuning dibilas dengan akuades steril sebanyak 3 kali. Kemudian sampel dihomogenkan dengan akuades steril dengan perbandingan 1 : 9 w/v. Larutan sampel (*homogenate*) diencerkan hingga 10^{-2} (100 kali pengenceran) dan ditanam (*spread plate*) pada *marine agar*. Koloni yang diperoleh dimurnikan (*screening*) untuk diidentifikasi secara morfologi dan fisiologis berdasarkan Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Isolat murni bakteri ditanam dalam media agar miring dan diinkubasi pada suhu 25°C serta dilakukan peremajaan setiap satu bulan sekali. Isolat murni bakteri juga dikultur dalam media cair kemudian dipindahkan dalam *cryotube* dengan penambahan gliserin untuk disimpan dalam suhu -80 °C.

Identifikasi bakteri

Semua koloni bakteri yang tumbuh di media *marine agar* dikarakterisasi berdasarkan bentuk dan warna koloni bakteri. Jika terdapat koloni bakteri yang sama pada setiap umur larva, maka dianggap sebagai satu koloni yang sama. Koloni-koloni bakteri yang berbeda dari bentuk dan warnanya, selanjutnya dilakukan uji gram, katalase dan peroksidase. Bakteri-bakteri tersebut juga diekstraksi menggunakan *Nuclei Lysis Solution* (Promega) mengikuti prosedur. Genom bakteri diamplifikasi berdasarkan urutan nukleotida dalam gen ribosom 16S dengan menggunakan pasangan primer 27F dan 1492R. Urutan nukleotida ampikon gen 16S diketahui dengan *ABI sequencer* (Macrogen, Korea Selatan). Kesamaan masing-masing urutan nukleotida dianalisis dengan menggunakan BLAST. Sekuen-sequen identik yang diperoleh kemudian dianalisis kekerabatannya secara filogenetik menggunakan metode *Neighbour Joining* dengan *bootstrap* 1000 kali.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil isolasi bakteri pada larva tuna sirip kuning umur 5-20 hari diperoleh 9 isolat bakteri (Gambar 1). Isolat bakteri terdiri dari 4 isolat bakteri gram negatif dan 5 isolat gram positif (Tabel 1). Semua isolat bakteri bereaksi positif terhadap uji katalase dan

peroksidase yang menunjukkan bahwa bakteri tersebut mempunyai enzim katalase dan dehidrogenase untuk menguraikan H_2O_2 (hidrogen peroksida) menjadi oksigen dan air.

Gambar 1. Morfologi koloni bakteri pada media TSA (dalam lingkaran)

Sedikitnya jumlah dan jenis koloni bakteri yang diperoleh dari larva ikan tuna kemungkinan diakibatkan karena karakter dari ikan tuna yang merupakan perenang cepat sehingga memiliki tingkat kekebalan tubuh yang lebih tinggi.

Tabel 1. Karakteristik koloni bakteri yang diisolasi dari larva tuna sirip kuning.

Isolat	Permukaan	Tepi	Warna	Gram	Uji Katalase	Uji Peroksidase
1	Halus	Rata	Putih	+	+	+
2	Halus	Bergelombang	Putih	-	+	+
3	Kasar	Berlekuk	Krem	+	+	+
4	Berkilau	Rata	Putih	+	+	+
5	Berkilau	Bergelombang	Putih	-	+	+
6	Kasar	Berlekuk	Krem	+	+	+
7	Kasar	Berlekuk	Krem	+	+	+
8	Kasar	Bergerigi	Krem	-	+	+
9	Halus	Rata	Krem	-	+	+

Hasil analisa sekuen DNA dengan BLAST diketahui bahwa 9 isolat bakteri tersebut identik dengan isolat bakteri dari genus *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. dan *Vibrio* spp (97%-100%). Ketiga genus tersebut *Bacillus cereus* (KT957392.1), *B. methylotrophicus* (KM659215.1), *B. amyloliquefaciens* (JF899274.1), *Pseudomonas plecoglossicida* (DQ095910.1), *P. putida* (KJ534476.1), dan *Vibrio* sp. strain voc (KX279503.1). Berdasarkan analisis filogenetik diketahui bahwa isolat 1, 2, 5, 8 berkerabat dekat dengan genus *Pseudomonas*, sementara isolat 3, 4, 6, 9 dan 7 berkerabat dekat dengan genus *Bacillus* (Gambar 2). Kesembilan isolat tidak berkerabat dekat dengan *Vibrio* sp. Strain Voc meskipun

berdasarkan analisa dengan BLAST identik hingga 97%.

Gambar 2. Kekerabatan filogenetik antara isolat-isolat bakteri dan isolat lain yang identik

Hasil tersebut menunjukkan bahwa bakteri pada larva ikan tuna didominasi oleh bakteri *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. dan *Vibrio* sp. Hal tersebut kemungkinan karena larva yang digunakan dibilas terlebih dahulu dalam akuades sehingga bakteri yang menempel pada bagian luar larva (kulit, sirip, ekor) ikut terbilas atau larut dalam akuades. Sehingga bakteri yang terisolasi merupakan bakteri yang terdapat dalam tubuh larva tersebut. Bakteri dari genus *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. dan *Vibrio* spp. merupakan bakteri yang dominan ditemukan dalam saluran pencernaan sebagai mikroflora dalam membantu sistem pencernaan ikan laut [13, 14].

Ikan secara alami telah memiliki populasi bakteri di kulit, insang, saluran pencernaan, dan organ dalam. Selain itu, organ-organ internal (ginjal, hati, dan limpa) dari ikan yang sehat mungkin mengandung bakteri, akan tetapi apakah otot benar-benar steril atau tidak dari bakteri masih belum diketahui secara pasti [13]. Bakteri yang telah ditemukan dari permukaan ikan laut meliputi *Acinetobacter calcoaceticus*, *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus cereus*, *B. firmus*, *Caulobacter*, *coryneforms*, *Cytophaga* / *Flexibacter*, *E. coli*, *Hyphomicrobium vulgare*, *Photobacterium* spp. (*P. angustum*, *P. logei*, *P. damsela*, *P. damsela* subsp.

Piscicida), *Prosthecomicrobium*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. marina*, dan *Vibrio* spp. (termasuk *V. harveyi*, *V. carchariae*, *V. alginolyticus*, *V. albensis*, *V. anguillarum*, *V. splendidus* biotipe I, *V. fischeri*, *V. ordalii*, dan spesies baru *V. scophthalmi* di permukaan turbot/*Scophthalmus maximus*) [14,13,15].

Pada stadia awal larva, sedikit bakteri yang ditemukan di saluran pencernaan yaitu dari taksa coryneforms dan *Pseudomonas* [16]. Beberapa bakteri kemungkinan tertelan oleh larva pada stadia awal (ketika masih mengandung kuning telur) yang membentuk mikroflora awal usus [17]. Pada larva turbot, kolonisasi bakteri pada saluran pencernaan terjadi pada saat dimulainya pemberian pakan alami. Mikroflora usus larva turbot didominasi oleh *Aeromonas* spp. dan *Vibrio* spp. [18]. Hal yang sama juga dilaporkan pada mikroflora usus larva kakap (*Dicentrarchus labrax* dan terjadi ketika larva diberi pakan alami (rotifers dan artemia). Mikroflora usus lebih didominasi oleh bakteri *Vibrio* spp. (*V. anguillarum*, *V. tubiashii*, *V. alginolyticus*, *V. proteolyticus*, *V. harveyi* dan *V. natriegens*) dan kelompok non-*Vibrio* [19]. Pada ikan cod (*Gadus morhua*), bakteri yang dominan terdapat pada larva setelah diberi pakan yaitu α -proteobacteria. Akan tetapi, pada larva yang sakit didominasi oleh bakteri *Vibrio* spp. (*V. xuii* dan *V. logei*) [20].

Populasi bakteri *Vibrio* spp. pada hati juvenil ikan kerapu hibrida “cantang” yang dibenihkan di hatcheri juga tinggi (sampai 10^{4-6} CFU/gram) [21]. Hati dan ginjal ikan turbot sehat juga dilaporkan mengandung bakteri yang sebagian besar dari taksa *Pseudomonas* dan *Vibrio* spp. (*V. fischeri*, *V. harveyi*, *V. pelagius* dan *V. splendidus*) [22]. Keberadaan beberapa bakteri tersebut dalam organ dalam ikan belum jelas. Selain itu, spekulasi apakah ikan berada pada tahap paling awal dari siklus infeksi masih perlu uji lebih lanjut [13,14].

Jenis bakteri yang mendominasi ikan berbeda-beda tergantung dari spesies ikan. Walaupun ikan-ikan tersebut dipelihara dalam lingkungan yang sama [23]. Jumlah dan komposisi populasi bakteri sering mencerminkan kondisi air yang digunakan [13, 14]. Populasi bakteri air (total bakteri dan *Vibrio* spp.) pada pembenihan ikan

kerapu sunu (*Plectropomus leopardus*) meningkat seiring dengan pertambahan umur larva. Populasi bakteri meningkat tajam di awal pemeliharaan larva sebelum dilakukan pergantian air. Populasi bakteri akan menurun setelah pergantian air pemeliharaan larva, namun akan populasi bakteri meningkat kembali setelah seiring dengan bertambahnya umur larva (kepadatan larva dalam bak pemeliharaan bertambah seiring dengan bertambahnya umur larva) [24]. Mikroflora invertebrata laut dapat menampung bakteri yang bersifat patogen terhadap organisme lain sehingga invertebrata co-penghuni atau organisme pemakan dapat berfungsi sebagai vektor untuk transfeksi patogen ikan. Dalam sistem pembenihan ikan secara intensif, jumlah bakteri dijaga tetap rendah dengan pengolahan air dan desinfeksi. Pendekatan ini, dapat mengganggu keseimbangan antara komunitas mikroba, atau mendukung proliferasi bakteri oportunistik atau perkembangan komunitas bakteri yang tidak terduga. Dengan demikian diperlukan kontrol mikroba yang lebih baik selama produksi larva dengan penggunaan probiotik [10].

KESIMPULAN

Hasil identifikasi isolat bakteri yang diisolasi dari larva tuna sirip kuning yang dibenihkan di hatcheri Balai Besar Riset Budidaya Laut dan Penyuluhan Perikanan, Gondol Bali ditemukan bakteri yang identik dengan *Bacillus cereus*, *B. methylothrophicus*, *B. amyloliquefaciens*, *Pseudomonas plecoglossicida*, *P. putida* dan *Vibrio* sp strain voc.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Ir. Jhon H. Hutapea, M.Sc. sebagai Koordinator Tuna, tim teknisi pembenihan tuna dan tim teknisi Lab. Patologi, Balai Besar Riset Budidaya Laut dan Penyuluhan Perikanan, Gondol-Bali yang telah membantu kegiatan penelitian ini. Unit penelitian ini dibiayai dari APBN TA. 2016.

DAFTAR PUSATAKA

- [1] FAO, Recent developments in tuna industry. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper. Food and Agriculture Organization of United Nation, Rome*, 2010.
- [2] J.H. Hutapea, Embryo development of Yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) at different incubation temperature. *Indonesian Aquaculture Journal* 2(2): 99-105, 2007.
- [3] J.H. Hutapea, I.G.N. Permana, & R. Andamari, Optimum capture size of Yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) Broodstock. *Prosiding Akuakultur Indonesia*, 5-7 Juni 2007. Surabaya. Pp: 312-317.
- [4] J.H. Hutapea, I.G.N., Permana, & A. Setiadi, Pemeliharaan induk ikan tuna sirip kuning dalam bak terkontrol. *Jurnal Riset Akuakultur* 5(1): 79-90, 2010.
- [5] J.H. Hutapea, A. Setiadi, Gunawan, & G.N. Permana, Perbaikan teknik penanganan calon induk ikan tuna sirip kuning (*Thunnus albacares*) pasca penangkapan dan dalam bak pengobatan. *Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur. Pusat Penelitian Pengembangan Perikanan Budidaya*, Pp: 191-199, 2010.
- [6] J.H. Hutapea, A. Setiadi, Gunawan, & I.G.N. Permana. Pembesaran ikan tuna sirip kuning, *Thunnus albacares* media budidaya yang berbeda di perairan Bali Utara: media keramba jaring apung dan bak beton. *Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur. Pusat Penelitian Pengembangan Perikanan Budidaya*, Pp: 191-199, 2014.
- [7] R. Andamari, J.H. Hutapea, & J.I. Prisantoso, Aspek reproduksi ikan tuna sirip kuning (*Thunnus albacares*). *Jurnal Ilmu Teknologi Kelautan Tropis* 4(1), 89-96, 2012.
- [8] G. Patridge, The International Experience. In: Patridge, G (ed.). *Hatchery Production of Yellowfin Tuna. International Specialised Skills Institute Inc. Melbourne-Australia*, Pp. 11-25, 2009.
- [9] P. Reglero, A. Ortega, E. Blanco, Ø. Fiksen, F.J. Viguri, F.D.L. Gándara, M. Seoka, & A. Folkvord, Size-related differences in growth and survival in piscivorous fish larvae fed different prey types. *Journal Aquaculture* 433, 94–101, 2014.
- [10] J. A. Olafsen, Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture* 200, 223–247, 2001
- [11] M. Dennis, & Q.M.L. Vennart, Emerging and endemic aquatic animal disease in Australasia. Notes prepared for the *Wildlife Pathology Short Course, Taronga Zoo*, August 2008.
- [12] K. Yuasa, T. Kamaishi, K-I. Mori, J.H. Hutapea, G.N. Permana, & A. Nakazawa, Infection by protozoan endoparasites of the genus *Ichthyodinium* in embryos and yolk-sac larvae of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). *Fish Pathology* 42(1), 59-66, 2007.
- [13] B. Austin, The bacterial microflora of fish. Mini-Review. *The Scientific World Journal* 2, 558-572, 2002.
- [14] B. Austin, The bacterial microflora of fish, revised. *The Scientific World J.* 6, 931–945, 2006.
- [15] M. Montes, M.J. Perez, & T.P. Nieto, Numerical taxonomy of gram-negative, facultative anaerobic bacteria isolated from skin of turbot (*Scophthalmus maximus*) and surrounding water. *Syst. Appl. Microbiol.* 22, 604–618, 1999.
- [16] M. Yoshimizu, T. Kimura, & M. Sakai, Microflora of the embryo and the fry of salmonids. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish* 46, 967–975, 1980.
- [17] G.H. Hansen, & J.A. Olafsen, Bacterial interactions in early life stages of

- marine cold water fish. *Microb. Ecol.* 38, 1–26, 1999.
- [18] P.D. Munro, A. Barbour, & T.H. Birkbeck, Comparison of the gut bacterial-flora of start-feeding larval turbot reared under different conditions. *J. Appl. Bacteriol.* 77, 560–566, 1994.
- [19] L. Grisez, J. Reyniers, L. Verdonck, J. Swings, & F. Ollevier, Dominant intestinal microflora of sea bream and sea bass larvae, from two hatcheries, during larval development. *Aquaculture* 155, 387–399, 1997.
- [20] L. Brunvold, R.-A. Sandaa, H. Mikkelsen, E. Welde, H. Bleie, & Ø. Bergh, Characterisation of bacterial communities associated with early stages of intensively reared cod (*Gadus morhua*) using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). *Aquaculture* 272, 319–327. 2007.
- [21] K. Mahardika, A. Nasukha, R. Septory, I. Mastuti, D. Roza, S. Ismi, N.W.W Astuti, D. Syahidah, Sudewi, Ananto, & Zafran, Pemantauan lingkungan dan kejadian penyakit di kawasan budidaya laut, Bali Utara. Laporan teknis Akhir Penelitian, Balai Besar Riset Budidaya Laut dan Penyuluhan Perikanan, Pusat Riset Perikanan Budidaya, Badan Riset dan Sumber Daya Manusia Kelautan dan Perikanan, kementrian KKP, 2018.
- [22] A.E. Toranzo, B. Novoa, J.L. Romalde, S. Nunez, S. Devesa, E. Marino, R. Silva, E. Martinez, A. Figueras, & J.L. Barja, Microflora associated with healthy and diseased turbot (*Scophthalmus maximus*) from 3 farms in Northwest Spain. *Aquaculture* 114, 189–202, 1993.
- [23] X. Li, Y. Yu, W. Feng, Q. Yan, & Y. Gong, Host Species as a Strong Determinant of the Intestinal Microbiota of Fish Larvae. *The Journal of Microbiology* 50(1), pp. 29–37, 2012.
- [24] K. Mahardika, I. Mastuti, Sudewi, Y.N. Asih, A. Muzaki, & I.N.A. Giri, Aplikasi vaksin bivalen (VNN dan GSDIV) pada pemeliharaan larva ikan kerapu sunu, *Plectropomus leopardus*. *Jurnal Riset Akuakultur* 13(4), 2018.