

PERHITUNGAN SECARA LANGSUNG BAKTERI LAUT MENGUNAKAN TEKNIK MIKROSKOP EPIFLUORESENS

oleh

Ruyitno¹⁾

ABSTRACT

DIRECT COUNT METHOD OF MARINE BACTERIA BY EPIFLUORESCENCE MICROSCOPE TECHNIQUE. *The technique involved some processes, nevertheless the criteria for successful the method is simple; all the bacteria must be retained by on the filter, all the bacteria must be visible at the surface filter, and optical conditions must produce high contrast between the bacteria and the background. This method relatively simple, rapid and accurate.*

PENDAHULUAN

Menurut JANNASCH & JONES (1959) indeks aktivitas dan nilai biomassa mikroorganisme dalam suatu perairan dapat ditunjukkan dengan mengetahui jumlah mikroorganisme dalam perairan tersebut. Untuk mengetahui jumlah mikroorganisme dalam suatu perairan ada dua cara dasar yaitu :

- Perhitungan mikroorganisme secara langsung (direct count).
- Perhitungan bakteri secara tidak langsung (indirect count).

Perhitungan mikroorganisme secara langsung digunakan untuk menghitung keseluruhan mikroorganisme yang hidup dan yang mati. Sedangkan perhitungan secara tidak langsung biasanya digunakan untuk menghitung mikroorganisme yang masih hidup saja (viable count). Walaupun demikian cara ini juga bisa digunakan untuk menghitung jumlah mikro-

organisme secara keseluruhan baik yang masih hidup maupun yang sudah mati (YUTONO *et al.* 1973). Kedua cara tersebut di atas masing-masing masih dapat dibagi lagi menjadi beberapa teknik tergantung dari keperluannya.

Teknik mikroskop epifluoresens adalah salah satu teknik perhitungan mikroorganisme secara langsung yang banyak dipakai. Berikut ini adalah uraian bagaimana tahapan pengerjaan metode mikroskop epifluoresens.

PERANAN BAKTERI DI LAUT

Bakteri adalah salah satu makhluk hidup yang tidak bisa dilihat dengan mata biasa, karena ukurannya yang sangat kecil yaitu dalam mikron (1 mikron = 0,001 mm), Sedangkan mata manusia hanya mampu melihat benda-benda yang ukuran garis tengah-

¹⁾ Balai Penelitian dan Pengembangan Oseanografi, Pusat Penelitian dan Pengembangan Oseanologi - LIPI, Jakarta.

nya tidak kurang dari 0,1 mm. Oleh karena itu, apabila kita ingin melihat bakteri diperlukan alat pembesar yang disebut mikroskop.

Di laut penyebaran bakteri sangat luas, dari permukaan hingga ke dasar laut yang dalam, di air maupun di lumpurnya. HOPPE (1986) membagi lautan menjadi 4 kompartemen (zona) berdasarkan sifat-sifat ekologi dan biokimianya. Pembagian tersebut diikuti juga dengan pembagian kelompok bakteri yang berkembang di tiap kompartemen tersebut. Ke 4 kompartemen tersebut ialah :

1. Kompartemen neustonik.

Kompartemen ini terletak beberapa mikrometer di atas lapisan permukaan air laut ($\pm 150 \mu\text{m}$), merupakan daerah pertukaran antara air laut dan udara di atasnya. Pada kompartemen ini substansi yang sukar larut dalam air (hidrophobic) seperti minyak, lemak dan pestisida tertentu akan terakumulasi. Adanya substansi ini menyebabkan berkembangnya kelompok bakteri tertentu yang mampu menguraikan substansi tersebut. Kelompok bakteri ini disebut kelompok bakteri neuston yang merupakan gabungan antara bakteri laut dan bakteri yang hidup di udara. Oleh karena itu, jumlahnya lebih tinggi daripada jumlah bakteri yang hidup di lapisan air lautnya yaitu mencapai $10^8/\text{ml}$. Untuk mempelajari kelompok bakteri neuston ini sangat susah oleh karena habitatnya tidak stabil. dipengaruhi oleh gelombang laut dan gelembung udara dari gerakan gelombang laut tersebut.

2. Kompartemen eupotik

Kompartemen ini adalah kompartemen lautan yang masih dapat ditembus oleh cahaya matahari. Kedalamannya bervariasi antara 20 m - 200 m tergantung dari kejernihan air dan intensitas cahaya

matahari. Kelompok bakteri yang berkembang pada kompartemen ini ialah kelompok bakteri yang menguraikan substansi yang larut dalam air atau yang mudah terurai. Substansi ini berasal dari liasil ekskresi plankton dan plankton yang mati. Untuk daerah perairan pantai substansi terlarut yang berasal dari daratan ikut menambah substansi terlarut yang sudah ada di laut. Kelompok bakteri yang hidup pada kompartemen ini umumnya hidup bebas dan kepadatannya berkisar antara $10^5/\text{ml}$ dan $10^6/\text{ml}$.

3. Kompartemen apotik

Kompartemen ini berada di bawah kompartemen eupotik. Pada kompartemen ini cahaya matahari sudah tidak bisa lagi menyinari oleh karena itu pada kompartemen ini gelap, yang merupakan bagian terbesar dari lautan. Kelompok bakteri yang berkembang pada kompartemen ini ialah kelompok bakteri yang mampu menguraikan partikel organik dan substansi polymer organik terlarut. Kepadatan bakteri pada kompartemen ini lebih rendah daripada kepadatan bakteri pada kompartemen eupotik. Kepadatannya kurang dari $10^4/\text{ml}$ dan makin ke bawah makin berkurang kepadatannya, kecuali di daerah yang berbatasan dengan sedimen (lumpur). Umumnya kelompok bakteri yang berada pada kompartemen ini hidupnya melekat pada partikel organik.

4. Kompartemen dasar laut

Pada daerah continental shelf, bakteri yang berada dalam sedimen (lumpur) maupun pada lapisan air yang menutupinya mempunyai aktivitas penguraian partikel organik yang tinggi. Sedangkan pada sedimen yang berada di dasar laut yang dalam, aktivitasnya rendah. Kepadatan bakteri pada kompartemen ini lebih

tinggi daripada kepadatan bakteri pada kompartemen apotik. Bahkan untuk laut dangkal kepadatan bakteri di sedimennya dapat mencapai $10^{12}/\text{gr}$. Pada kompartemen dasar laut (sedimen) kelompok bakteri yang dominan ialah kelompok bakteri yang memainkan pengaturan siklus nitrogen dan sulfur.

Uraian singkat tentang status bakteri dan proses degradasinya pada kompartemen-kompartemen di lautan tercantum dalam Tabel 1.

Kepadatan bakteri pada masing-masing kompartemen tersebut di atas diamati dengan menggunakan metode mikroskop epifluoresens. Berikut ini diuraikan tahapan pengerjaan metode mikroskop epifluoresens untuk menghitung bakteri secara langsung pada perairan laut.

CARA KERJA

A. Pengambilan contoh air

Pada prinsipnya pengambilan contoh air untuk keperluan analisis bakteri haruslah secara aseptis. Dengan demikian diperlukan tempat yang steril untuk mengambil contoh air. Hal ini untuk menghindari kontaminasi dari bakteri yang sebelumnya tidak berada dalam contoh air tersebut. Tempat itu pada umumnya adalah botol gelas yang mempunyai mulut besar (lebar) dan volumenya berkisar antara 200 ml sampai 300 ml. Dipilihnya botol gelas oleh karena tahan terhadap pemanasan pada waktu disterilkan menggunakan autoclave. Tempat yang bukan dari botol gelas pun juga dapat dipakai asal sebelum digunakan untuk mengambil contoh air disterilkan lebih dahulu dengan dicuci alkohol 70%.

Tabel 1. Sistem kompartemen di lautan, status bakteri dan proses penguraian substansi organiknya

Kompartemen	Status bakteri	Proses penguraiannya
– Neustonik (sampai 150 μm di atas lapisan permukaan laut)	Kelompok bakteri yang mempunyai dinding sel lipopilik. dominan	Menguraikan substrat yang mengumpul di daerah antara lapisan permukaan laut dan udara (lemak dan hidrokarbon).
– Eupotik (20 m–200 m).	Kelompok bakteri yang hidup bebas, dominan.	Menguraikan substrat hasil ekskresi dari plankton dengan enzim proteolitik.
– Apotik (daerah gelap)	Kelompok bakteri yang hidupnya melekat pada substrat, dominan.	Menguraikan substrat partikel organik dan polimer organik dengan enzim proteolitik dan hidrolisis.
– Dasar laut (sedimen dasar).	Kelompok bakteri yang hidup melekat pada substrat, dominan.	Aktivitas penguraian substrat organik detritus secara enzimatik dan secara anaerob.

B. Preservasi (pengawetan) contoh air

Contoh air laut yang telah diambil apabila jumlah bakterinya segera dianalisis tidak perlu ditambah zat pengawet. Namun bila contoh air laut tersebut tidak segera dianalisis maka diperlukan pemberian zat pengawet segera setelah pengambilan. Hal ini untuk menghindari berkembang biak bakteri sehingga tidak menggambarkan kondisi mikrobiologis sebenarnya kondisi perairan tersebut. Zat pengawet adalah senyawa kimia yang digunakan untuk mengawetkan atau mencegah kerusakan suatu bahan dari gangguan mikroorganisme. Jadi fungsi "preservative" ialah menjaga agar bahan yang telah diberi zat pengawet tidak mengalami perubahan selama jangka waktu tertentu penyimpanan.

Formaldehida dan glutaraldehida adalah zat pengawet yang memperoleh rekomendasi sebagai zat pengawet contoh air (termasuk juga air laut) yang tidak segera dianalisis jumlah bakterinya (POMROY 1984). Ini disebabkan senyawa aldehida tersebut tidak menyebabkan kerusakan asam nukleat bakteri (HOBBIE *et al.* 1977) tempat cat atau pewarna fluoresens melekat. Menurut DALEY & HOBBIE (1975) contoh air yang ditambah zat pengawet dan suhunya diatur 37°C akan memperoleh perhitungan jumlah bakteri yang tetap selama 6 hari. Pada suhu 5°C stabil dalam jangka waktu dua minggu baik jumlahnya maupun warna fluoresensnya. Keuntungan dengan pemberian zat pengawet menurut ZIMMERMANN & MEYER-REIL (1974) dapat menambah kontras warna fluoresens dibandingkan dengan contoh air yang tidak diberi zat pengawet. Kelemahannya ialah zat pengawet formaldehida yang ditambahkan ke dalam contoh air dapat mengalami polimerisasi menjadi paraformaldehida dan glutaraldehida akan mengendap terutama jika suhunya naik menjadi 15°C (POMROY 1984).

Endapan ini tentu saja akan menumpuk di permukaan filter bila contoh airnya disaring. Akibatnya mengganggu pengamatan waktu perhitungan jumlah bakterinya.

C. Penyaringan contoh air laut menggunakan filter membran.

1. Volume contoh air laut yang disaring

Volume contoh air laut yang hendak disaring harus dapat menghasilkan distribusi bakteri yang merata di permukaan filter membran. Menurut JONES & SIMON (1975) minimal volume contoh air yang akan disaring ialah 6 ml sedangkan menurut para pakar yang lain cukup 2 ml, atau volume air yang disaring menghasilkan jumlah bakteri antara 10 sampai 30 tiap bidang pemandangan mikroskop. Namun bila jumlah bakteri per bidang pandang mikroskop lebih dari 30 bakteri maka contoh air perlu diencerkan dengan menggunakan air pengencer yang berasal dari tempat pengambilan contoh air tersebut. Tentunya air pengencer ini harus bebas bakteri untuk menghindari bertambahnya bakteri dari air pengencer tersebut. Supaya air pengencer ini bebas bakteri maka harus disaring dengan filter membran yang pori-porinya 0,2 μm .

2. Filter membran

Filter yang digunakan untuk menyaring contoh air laut haruslah memenuhi syarat-syarat sebagai berikut :

- a. Dapat menahan semua bakteri dalam contoh air laut yang disaring. Ini berarti pori-pori filter membran harus lebih kecil dari bakteri.
- b. Mempunyai latar belakang (background) fluoresens yang rendah sehingga tidak mengganggu warna fluoresens bakteri yang dihitung. Dengan demikian mempermudah perhitungannya.

c. Mempunyai permukaan yang halus (licin) dan testur yang baik, tipis dan tidak bergaris. Ini akan berpengaruh terhadap sebaran bakteri di permukaan filter. Permukaan filter yang halus ini akan mempengaruhi menyebarnya/mematanya contoh air yang disaring pada seluruh permukaan filter. Dengan demikian penyebaran bakteri di permukaan filterpun akan merata juga. Filter yang tipis menghindari terperangkapnya sejumlah bakteri di dalam filter tersebut, sehingga diperoleh hasil perhitungan yang maksimal. Sedangkan filter yang bergaris mengganggu penyebaran bakteri di permukaan filter. Ternyata dari banyak jenis filter yang beredar, filter membran nuclepore yang bahan dasarnya adalah polycarbonat pori-porinya $0,2 \mu\text{m}$ dan garis tengahnya 25 mm mendapat rekomendasi sebagai filter membran untuk digunakan dalam perhitungan jumlah bakteri menggunakan metode mikroskop epifluoresens (PARSONS *et al.* 1984). Ini disebabkan hasil perhitungan bakteri dengan menggunakan metode ini setelah dicek dengan metode replika karbon mikroskop elektron transmisi (WATSON *et al.* 1977) maupun dengan metode elektron scanning (BOWDEN 1977) tidak menunjukkan hasil yang berbeda. Filter polycarbonate nuclepore tebalnya hanya $10 \mu\text{m}$ dan mempunyai keseragaman pori-pori yang tinggi. Namun jika filter nuclepore sukar diperoleh bisa juga menggunakan filter cellulose sartorius yang pori-porinya $0,22 \mu\text{m}$. Namun tentu saja hasil diperoleh tidak maksimal. Ini disebabkan filter cellulose sartorius lebih tebal dan permukaannya kasar sehingga banyak bakteri yang terperangkap di dalam filter yang akibatnya tidak akan terlihat di bawah

bidang pandang mikroskop dan terlepas dari perhitungan. Namun kedua jenis filter tersebut menimbulkan autofluoresens oleh karena itu, sebelum digunakan harus dicat dulu dengan irgalan hitam, sudan hitam atau larutan nigrosin untuk menghilangkan autofluoresensnya sekaligus memberikan daya kontras yang tinggi. Cara pengecatan membran filter.

1. Menggunakan irgalan hitam

2 gram irgalan hitam dilarutkan dengan 1 liter 2% asam asetat. Setelah larutan homogen kemudian disaring dengan menggunakan filter $0,22 \mu\text{m}$ supaya larutan ini bebas bakteri. Tuangkan larutan dalam botol gelas atau cawan petri secukupnya dan rendam filter sesuai dengan kebutuhan paling sedikit 4 jam.

2. Menggunakan sudan hitam

4 mg sudan hitam dilarutkan dengan 50 ml etanol. Kocok hingga homogen. Kemudian tambahkan 50 ml air suling. Saring dengan filter yang pori-porinya $0,2 \mu\text{m}$ sebelum dipakai untuk merendam filter-filter yang akan digunakan paling sedikit 4 jam.

3. Menggunakan larutan nigrosin

Rendam sejumlah filter yang akan digunakan di dalam larutan 0,2% nigrosin yang sebelumnya telah dibebaskan dari bakteri.

D. Pengecatan bakteri menggunakan cat fluorokhrom

Banyak cat fluorokhrom yang dapat digunakan untuk pewarnaan bakteri dalam contoh air tetapi yang umum digunakan ialah Acridine oranye (3,6-tetrametyl diaminoacridine). Ini disebabkan daya penge-

catannya sangat intensif dan warna fluoresens tahan lama. "Optimal fluorescence Acridine oranye" ialah pada konsentrasi 1 : 10.000 pada pH = 6,6 dan waktu pengecatannya 3 menit (ZIMMERMANN 1977) dengan penyinaran cahaya yang panjang gelombangnya 436 nm dan 490 nm. Cat acridine oranye ini melekat pada DNA dan RNA bakteri. Untuk perairan yang subur (eutrophic), yang banyak kandungan sestonnya dan perairan yang kandungan asam humusnya tinggi penggunaan acridine oranye kurang baik. Pada perairan yang kandungan sestonnya tinggi akan diperoleh latar belakang warna kemerah-merahan menyebabkan kesukaran di dalam perhitungan bakteri. Sedangkan perairan yang kandungan asam humusnya tinggi acridine oranye akan diendapkan oleh material humus yang terlarut dan menyebabkan latar belakang yang silau, yang dengan sendirinya sukar untuk melakukan perhitungan bakterinya. Untuk perairan yang kaya seston cat yang sesuai untuk digunakan ialah DAPI (4,6-diamine-2-phenylindole). Cat ini adalah zat spesifik untuk pengecatan DNA. DNA-DAPI kompleks menghasilkan warna fluorescence biru bila disinari cahaya yang panjang gelombangnya 365 nm atau 390 nm sedangkan DAPI yang tidak terikat oleh DNA menghasilkan warna fluoresens kuning pucat. Menurut COLEMAN (dalam PORTER & FEIG 1980) konsentrasi pemakaiannya antara 0,05 sampai 0,10 $\mu\text{g/ml}$, dengan waktu pengecatan 5 menit. Untuk perairan yang kandungan asam humusnya tinggi diperlukan cat fluorokhrom acriflavine (BERGSTROM *et al.* 1986). Pemakaiannya dengan konsentrasi 1 dan 10 mM dengan waktu pengecatan antara 3-10 menit tergantung dari kandungan asam humusnya menggunakan cahaya yang panjang gelombangnya 430 nm - 490 nm.

Ada dua cara pengecatan bakteri dalam contoh air :

1. Pengecatan dilakukan sebelum contoh air disaring dengan menambahkan larutan cat fluorokhrom acridine oranye hingga konsentrasi akhirnya 0,01%. Setelah kira-kira 2 menit contoh air-car acridine oranye tersebut disaring. Kemudian dibilas dengan air pembilas bebas bakteri (air suling) untuk menghanyutkan sisa bakteri yang masih menempel pada gelas penyaring. Setelah itu filter penyaring tersebut segera diambil (selagi masih lembab) dan ditaruh di atas obyek gelas yang sebelumnya telah diolesi dengan minyak immersi. Sebelum ditutup dengan gelas penutup, filter penyaring lebih dulu diolesi dengan minyak immersi. Dan selanjutnya diperiksa di bawah mikroskop epifluoresens dengan perbesaran 1000 kali atau lebih (Okuler 10 kali, obyektif 100 kali). Hitung secara random 10 bidang pandang dan tiap bidang pandang tersebut berisi antara 10 sampai 30 bakteri. Jadi minimal jumlah bakteri yang dihitung per filter adalah 100 bakteri. Dengan cara ini mayoritas warna bakteri berwarna hijau sedangkan sebagian kecil berwarna merah oranye.
2. Cara kedua ini pengecatan dilakukan setelah contoh air disaring, baru ditambah cat larutan fluorochrom 2 ml. Setelah setengah menit sedot melalui pompa vakum. Dan cara kerja selanjutnya sama seperti cara di atas. Dengan cara ini mayoritas bakteri akan tampak berwarna merah oranye bila dilihat dengan mikroskop epifluoresens. Dari pengalaman, penulis lebih menyukai cara yang pertama karena daya kontras fluorescennya lebih tinggi.

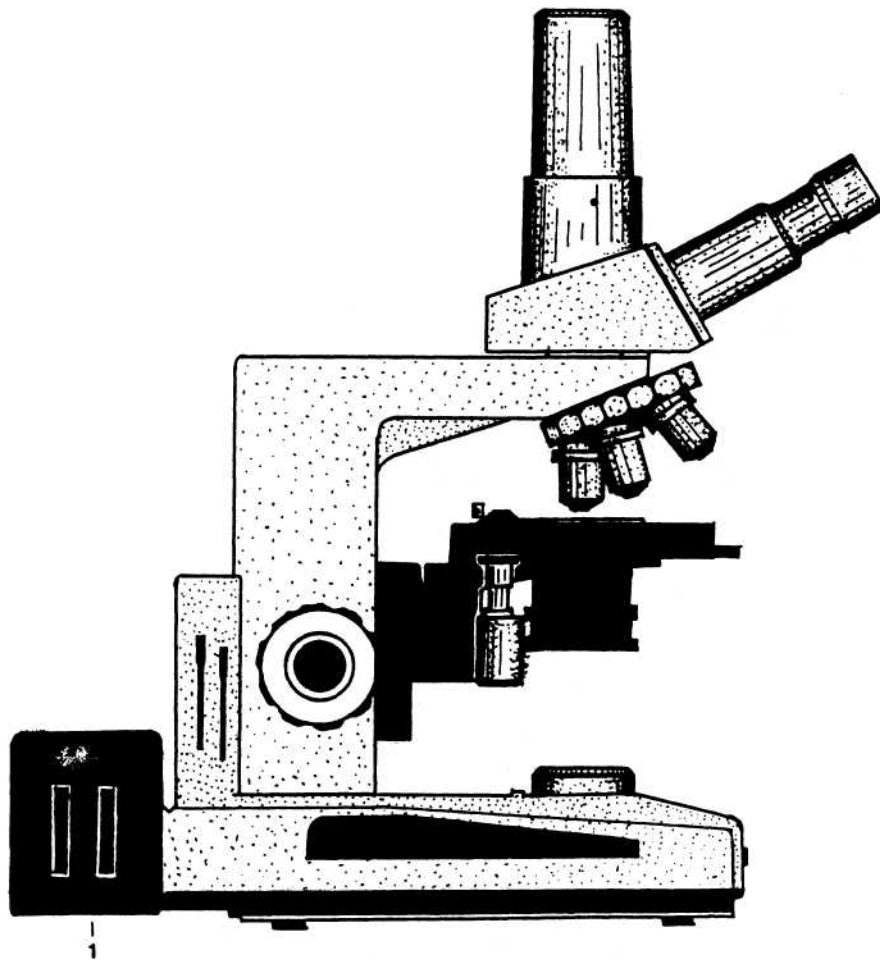
Untuk menghitung jumlah bakteri dalam contoh air, rumus yang digunakan adalah sebagai berikut :

$$\text{Jumlah bakteri/ml} = \bar{X} \times \frac{\text{area filter}}{\text{area bidang pandang mikroskop}} \times \frac{1}{\text{jumlah contoh air yang disaring.}}$$

- X adalah rata-rata jumlah bakteri yang dihitung dari sepuluh bidang pandang mikroskop.
- Area filter adalah luas area permukaan filter yang tertutup oleh contoh air yang disaring (mm²).
- Area bidang pandang mikroskop adalah

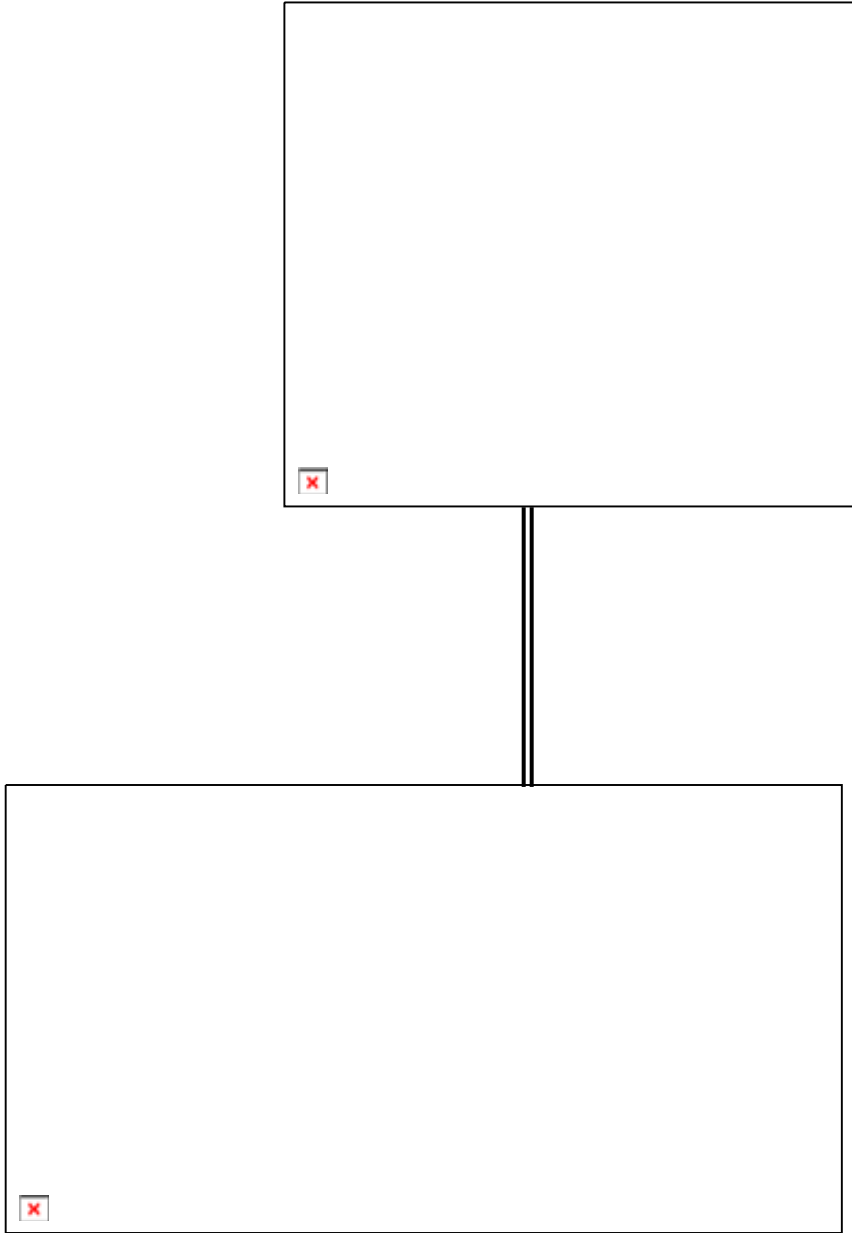
luas area yang terlihat pada waktu kita melihat obyek dengan mikroskop (μm²)

Berikut ini adalah gambar salah satu mikroskop epifluoresens buatan NIKON dan gambar satu set alat penyaring contoh air yang akan dihitung jumlah total bakterinya sebagai Gambar 1 dan Gambar 2.



Gambar 1. Salah satu contoh mikroskop epifluoresens buatan NIKON.

1. Adalah ruang tempat lampu halogen yang digunakan untuk penyinaran cat fluorescence yang telah melekat pada bakteri.



Gambar 2. Satu set alat penyaring contoh air yang akan dihitung jumlah total bakterinya. 1. Tabung penampung contoh air yang akan disaring. 2. Tempat filter yang digunakan untuk menyaring contoh air, garis tengahnya 25 mm dan pori-porinya 0.2 μm . 3. Tempat penampungan contoh air setelah disaring melalui filter. 4. Pompa vakum tangan yang digunakan untuk menyedot contoh air.

DAFTAR PUSTAKA

- BERGSTROM, I., A. HEINANEN, and K. SALONEN 1986. Comparison of Acridine orange, Acriflavine, and Bisbenzimedestains for enumeration of bacteria in clear and humic waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 51 (3) : 664-667.
- BODWEN, W.B. 1977. Comparison of two direct count techniques for enumerating aquatic. *Appl. Environ. Microbiol.* 33 (5) : 1129-1232.
- DALEY, R.J. and J.E. HOBBIIE 1975. Direct counts of aquatic bacteria by modified epifluorescence technique. *Limnol. Oceanogr.* 20 : 875-882.
- HOBBIIE, J.E., R.J. DALEY, and S. JASPER 1977. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 33 (5) : 1225-1228.
- HOPPE, H.G. 1986. Degradation in sea water. *In: Biotechnology* (REHM, H.J. and G. REED eds.). Vol. 8. VCH Verlagsgesell mbh, D.6940 Weunheim (Federal Republic of Germany). 454—475.
- JANNASCH, H.W. and G.E. JONES 1959. Bacterial populations in sea water as determined by different methods of enumeration. *Limnol. Oceanogr.* 4 : 128-139.
- JONES. J.G. and B.M. SIMON 1975. An investigation of errors in direct counts of aquatic bacteria by epifluorescence microscopy, with reference to a new method for membrane filters. *J. Appl. Bact.* 39 : 317-329.
- JUTONO, S. JOEDORO, S. HARTADI, S. KABIRUN, SUHADI dan SOESANTO 1973. *Pedoman Praktikum Mikrobiologi Umum untuk Perguruan Tinggi*, Departemen Mikrobiologi Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 232 hal.
- PARSON, T.R., Y. MAITA, and C.M. LAILI 1984. *A Manual of chemical and biological methods for sea water analysis*. Pergamon Press, Oxford: 123-127.
- POMROY, A.J. 1984. Direct counting of bacteria preserved with lugol iodine solution. *Appl. Environ. Microbiol.* 47 : 1191-1192.
- PORTER, K.G. and Y.S. FEIG 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* 25 : 943-946.
- WATSON, S.W., T.J. NOVITSKY, H.L. QUINBY and F.W. VOLOIS 1977. Determination of bacterial number and biomass in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol* 33 : 940-946.
- ZIMMERMANN, R. and LA. MEYER-REIL 1974. A new method for fluorescence staining of bacterial populations on membrane filters. *Kiel Meeresforsch.* 30 : 24-27.
- ZIEMMERMANN, R. 1977. Estimation of bacterial number and biomass by epifluorescence microscopy and scanning electron microscopy. *In : Microbial ecology of brakish water environment.* (RHEINHEIMER, G. ed.). Springer Verlag : 103-120.