

Teknik Kultur Klon Spesies Dinoflagelata yang Menyebabkan *Red Tide* di Perairan Pantai Lido, Johor Bahru, Malaysia

ROZIRWAN

Program Studi Kelautan FMIPA, Universitas Sriwijaya, Sumatera Selatan, Indonesia

INTISARI: Studi ini dilakukan untuk menentukan kultur spesies dinoflagelata yang menyebabkan red tide di perairan Pantai Lido, Johor Bahru pada Juli tahun 2002. Kultur klon dibuat dalam medium ES-DK pada suhu 26°C dan siklus 14:10 jam terang gelap. Sel-sel yang dikultur berbentuk bulat bujur dengan panjang 13-22 μm dan lebar 12-19 μm . Isolat yang dikultur dapat hidup pada salinitas 10-35 PSU, sekalipun pertumbuhan optimumnya adalah 20-25 PSU. Isolat menggunakan amonia dan nitrat sebagai sumber nitrogennya dengan kepadatan tertinggi dalam kultur adalah sekitar 5.264 sel mL^{-1}

ABSTRACT: This study was carried out to determine the establish culture growth of the dinoflagellate species that formed massive blooms in Lido Beach, Johor Bahru in July 2002. Clonal cultures were established in ES-DK medium at 26°C under a 14:10 hour light dark cycle. Cultured cells were ovate in shape, with dimensions of 13-22 μm in length and 12-19 μm in width. In culture the isolates were able to grow at salinity of 10-35 PSU but the optimum growth was at 20-25 PSU. The isolates were able to utilize both ammonia and nitrate. Highest density obtained in cultures was circa 5.264 cells mL^{-1}

KEYWORDS: Dinoflagellate, Harmful Algal Bloom (HAB), *Prorocentrum minimum*, Red Tide

Januari 2010

1 PENDAHULUAN

Berbagai faktor penyebab meningkatnya peristiwa fenomena ledakan populasi algae berbahaya (*harmful algal bloom/HAB*) masih kurang difahami oleh para pakar kelautan. Beberapa kemungkinan yang menjadi penyebab peristiwa tersebut telah banyak didiskusikan seperti peningkatan aktivitas akuakultur di perairan pantai, pengaruh aktivitas manusia khususnya proses eutrofikasi, *upwelling*, pengangkutan sista rehat dinoflagelata dalam air balas kapal dan pemindahan stok kerang-kerangan ke daerah lain^[1,2]. Aspek-aspek ini terus diteliti secara intensif oleh para peneliti untuk memahami penyebab *red tide* dengan lebih baik. Keracunan manusia akibat HAB dinoflagelata dan diatom meliputi keracunan kerang-kerangan yang dapat melumpuhkan (PSP), diare (DSP), keracunan saraf (NSP), hilang ingatan (ASP) dan keracunan ciguatera (CFP).

Red tide terjadi di perairan Pantai Lido, Johor Bahru pada awal Juli 2002 dan bertahan selama beberapa bulan. Kejadian tersebut terjadi didekat daerah peternakan ikan dan kupang di Johor Bahru. Pada Kasus tersebut tidak ada laporan mengenai keracunan manusia, namun ditemukan banyak ikan yang mati. Pengamatan awal menunjukkan spesies tersebut diduga adalah *Prorocentrum balticum* atau *P. minimum*. Untuk memastikan hal tersebut, tindakan

identifikasi perlu dilakukan baik kajian morfologi dan molekular, fisiologi maupun tingkat ketoksikan spesies tersebut. Namun sebelum melakukan tahapan tersebut perlu dilakukan pengkulturan klon agar dapat mempertahankan keberadaan spesies tersebut.

2 BAHAN DAN METODE

2.1 Penyedia Medium Kultur

Medium yang digunakan untuk pengkulturan adalah medium ES-DK^[3] yang di per kaya dengan ekstrak tanah^[4]. Sampel tanah yang diperoleh dikeringkan dan dibuang daun, akar-akar serta serpihan batubatuan. Kemudian tanah tersebut dicampurkan dengan air suling pada nisbah 1:1 dan diautoklaf selama satu jam pada suhu 121°C. Setelah diautoklaf, sampel tersebut dibiarkan pada suhu kamar selama 2-3 hari. Selanjutnya cairan dipindahkan dengan pipet. Supernatant dipisahkan dengan cara *dicentrifuge* selama 5-6 menit pada kecepatan 5.000 rpm. Ekstrak disaring dengan membran saringan 0.45 μm dan autoklaf selama 45 menit pada suhu 121°C. Setelah diautoklaf, ekstrak tanah dibiarkan dingin untuk ditambahkan ke dalam medium secara aseptik.

Air laut yang digunakan untuk medium bersalinitas antara 26-28 PSU. Air laut ini disaring dengan membran saringan 0.22 μm dan dimasukkan ke dalam botol Teflon. Air laut tersebut diautoklaf pada suhu 121°C

TABEL 1: Komposisi dasar medium ES-DK; A = Komponen Medium, B = Kepekatan akhir dalam 1 L air laut, C = Kepekatan

A	B (g/L)	C (μM)
NaNO_3	32.30 mg	[N] = 380
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.656 mg	[P] = 12
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.080 mg	[Fe] = 4.16
$\text{Na}_2\text{-EDTA}$	3.860 mg	[EDTA] = 10.37
$\text{FeCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.620 mg	[Fe] = 0.42
H_3BO_3	2.651 mg	[B] = 42.88
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.320 mg	[Mn] = 1.89
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05 mg	[Zn] = 0.177
Ekstrak Tanah	8 mL	
Air Laut (Steril)	1000 mL	

TABEL 2: Komposisi dasar stok vitamin f/2; A = Komponen vitamin, B = Kepekatan akhir dalam 1 L air ddH₂O, C = Kepekatan

A	B ($\mu\text{g/L}$)	C (μM)
Biotin	0.5 μg	0.002
B ₁₂	0.5 μg	3.7×10^{-4}
Thiamin. HCl	0.5 μg	0.296

selama 40 menit. Setelah diautoklaf, didinginkan selama 1-2 hari sebelum digunakan dalam medium.

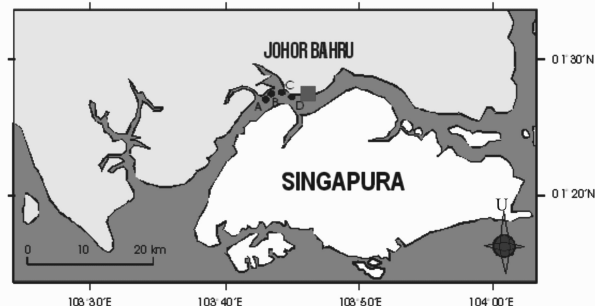
Selain penambahan ekstrak tanah, medium juga di tambah dengan nitrogen, fosforus dan unsur lainnya (Tabel 1) serta vitamin (Tabel 2). Larutan stok nutrisi dan vitamin disediakan secara terpisah, diautoklaf dan ditambahkan ke dalam air laut secara aseptik.

2.2 Pengambilan Sampel Lapangan

Sampel plankton diambil dari perairan Pantai Lido, Johor Bahru sewaktu peristiwa red tide pada Juli 2002. Pada posisi 01°27'17"-01°27'46" Utara dan 103°41'43"-103°43'29" Timur (Gambar 1). Sampel diambil dengan menggunakan jaring plankton berukuran 20 μm dan dibawa dalam keadaan hidup ke laboratorium

2.3 penyediaan Kultur Klon

Sel-sel spesies yang masih hidup diisolate satu persatu di bawah mikroskop menggunakan pipet kaca yang sangat halus. selanjutnya, sel-sel dibilas dengan menggunakan air laut steril sebanyak tiga hingga empat kali. Setelah pembilasan dilakukan, sel-sel itu dimasukkan satu persatu ke dalam perigi plat kultur tisu. Setiap perigi mengandung 150 μL medium ES-DK yang steril. Kemudian plat ditutup dan disimpan di dalam inkubator (Shel. Lab model 2015) pada suhu 26°C dengan siklus pencahayaan 14:10 jam



GAMBAR 1: Peta lokasi persampelan di perairan Pantai Lido, Johor Bahru

TABEL 3: Hasil pengukuran beberapa parameter fisik dan kimia air

Parameter	Satuan	Nilai
Suhu	°C	30.7 - 31.6
Salinitas	PSU	15 - 16
pH	-	8.65 - 8.98
Oksigen terlarut	mg L ⁻¹	0.5 - 18.0
N	mg L ⁻¹	0.0 - 1.1
P	mg L ⁻¹	0.17 - 3.60

terang gelap. Plat diperiksa setiap hari untuk memastikan terjadi pembelahan sel. Apabila sel dalam perigi telah mencapai >50 sel, maka sel-sel tersebut dipindahkan ke dalam tabung reaksi yang mengandung 10 mL medium ES-DK. Sel-sel dibiarkan membiak dalam tabung reaksi tersebut dan kemudian dipindahkan ke dalam tabung reaksi kultur 25 mL.

3 HASIL DAN PEMBAHASAN

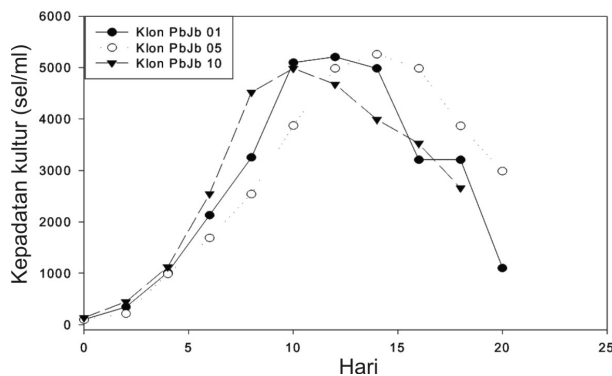
3.1 Hasil

3.1.1 Studi Lapangan

Kepekatan sel *P. minimum* mencapai 200.000 sel L⁻¹ pada peristiwa red tide di perairan Pantai Lido, Johor Bahru pada Juli 2002. Beberapa parameter fisik dan kimia perairan telah diukur dan hasilnya ditunjukkan dalam Tabel 3. Pada Kasus tersebut tidak ada laporan mengenai keracunan manusia, namun ditemukan banyak ikan yang mati. Sebanyak dua belas klon berhasil diisolate dan di kultur dalam medium ES-DK di laboratorium. Penelitian ini hanya menggunakan tiga klon yang dianggap sehat dan mewakili. Penamaan klon tersebut yaitu klon PbJb 01, PbJb 05 dan PbJb 10. Pelabelan dilakukan berdasarkan nama spesies dan asal isolat sel. PbJb bermakna *Prorocentrum balticum* Johor Bahru.

3.1.2 Pertumbuhan sel dalam medium ES-DK normal

Kepadatan sel maksimum 5.264 sel mL⁻¹, dengan tingkat pertumbuhan maksimum adalah antara 0.54-0.59 sel hari⁻¹. Hasil yang didapatkan menunjukkan kultur berada dalam fase eksponen antara hari ke-6 hingga hari ke-12 dan kultur mulai mati setelah hari ke-15.



GAMBAR 2: Pertumbuhan kultur *P. minimum* dalam medium ES-DK normal

3.2 Pembahasan

Fenomena ledakan populasi algae secara besar-besaran di perairan Pantai Lido, Johor Bahru, Juli 2002 disebabkan oleh dinoflagelata *Prorocentrum minimum* dengan kepadatan sel yang cukup tinggi. Fenomena tersebut pernah juga terjadi di Oslofjord kepadatan kepada sel mencapai 1.8×10^6 sel L⁻¹[5]. Hal ini ditunjang pernyataan Witek *et.al.*[6] bahwa pada Tahun 1997 kepadatan *P. minimum* mencapai 350 juta sel L⁻¹ di Teluk Gdansk, Polandia. Hal ini menunjukkan bahwa *P. minimum* adalah spesies kosmopolitan khususnya di kawasan muara.

Ketika peristiwa ledakan *P. minimum* salinitas perairan berada di tingkat yang sedang yaitu kisaran 15-16 PSU. Beberapa penelitian menyatakan bahwa *P. minimum* mengalami ledakan populasi pada salinitas yang berbeda-beda. Ledakan spesies tersebut yang dilaporkan di Bolinao, Semenanjung Filipina Utara pada Januari-Februari 2002 terjadi pada salinitas antara 30-35 PSU dengan kepadatan sel mencapai 4.7×10^5 sel L⁻¹[7]. Ledakan spesies ini juga terjadi di Teluk Mexico pada Agustus 2003, kisaran salinitas 20-35 PSU dengan kepadatan sel tertinggi mencapai 100.000 sel mL⁻¹[8]. Namun ledakan *P. minimum* di Teluk Chesapeake dilaporkan terjadi pada salinitas yang rendah, yaitu dalam kisaran 4.5-12.8 PSU[9]. Keadaan ini juga dilaporkan di Teluk Mecklenburg Tahun 1998. Kepadatan sel ketika ledakan mencapai 53.000-340.000 sel L⁻¹ pada salinitas 10 PSU[10]. Untuk itu, perubahan salinitas mungkin akan mempengaruhi persaingan antara spesies dalam komunitas fitoplankton di perairan. Hal ini dilihat dari spesies *P.*

minimum lebih dominan pada salinitas sedang. Penuhuran salinitas mungkin penyebab spesies ini menjadi dominan. Walau bagaimanapun hal ini sulit untuk dibuktikan tanpa data yang lengkap

Selain mempunyai ketahanan terhadap kisaran salinitas yang lebar *P. minimum* juga mempunyai batas toleransi hidup yang luas terhadap cahaya dan suhu[11]. Hal ini menyebabkan spesies ini berpotensi untuk mendominasi di berbagai perairan.

Kandungan oksigen terlarut (DO) ketika ledakan *P. minimum* pada lokasi penelitian menunjukkan kisaran yang lebar dengan nilai 0.5-18.0 mg L⁻¹. Pembelaahan sel yang sangat tinggi dapat menurunkan kadar DO dengan cepat. Hal ini dapat menyebabkan kemusnahan organisme laut lainnya, seperti peristiwa ikan mati secara besar-besaran di perairan Filipina Utara yang disebabkan ledakan *P. minimum*, DO di perairan berkisar 1.95-2.25 mg L⁻¹[7]. Keadaan ini akan lebih buruk jika pergerakan air dan pola pencampurannya rendah.

Kandungan nutrien di lokasi penelitian ketika terjadi ledakan *P. minimum* adalah rendah. Nitrogen terdapat dalam kisaran 0.0-1.1 mg N L⁻¹ dan Fosfat 0.17- 3.67 mg P L⁻¹, keadaan ini mirip dengan peristiwa di perairan Filipina Utara[7]. Peristiwa ledakan *P. minimum* juga terjadi di Teluk Mecklenburg, kandungan nutrien yang rendah dengan kepekatan nitrat dalam kisaran 0.31-3.14 μ g N L⁻¹, ammonia 0.16-0.53 μ g N L⁻¹ dan fosfat < 0.3 μ g P L⁻¹[12]. Kandungan nutrien yang rendah ketika ledakan disebabkan nutrien terikat lebih banyak dalam bioakumulasi algae.

Pertumbuhan spesies *P. minimum* dalam kultur kelompok ini tidak berbeda dengan pertumbuhan spesies dinoflagelata dari perairan Malaysia lainnya yang telah berhasil dikultur seperti *Pyrodinium bahamense* var. *compresum*, *Gymnodinium spp.*, *Alexandrium cohorticula*, *A. tamiyavanchii*, *A. leei*, *Coolia malayense* dan *Ostreopsis cf. ovata*[13]. Hasil penelitian Berland dan Grzebyk[14], Lomas dan Glibert[15] juga menunjukkan bahwa *P. minimum* adalah salah satu spesies yang mudah untuk dikultur.

4 KESIMPULAN

Pertumbuhan spesies *Prorocentrum minimum* sangat potensial pada perairan bersalinitas sedang. Spesies ini mudah untuk dikultur, walau dalam medium kandungan nutrien tergolong rendah. Keberadaan spesies ini untuk menciptakan *blooming* tidak dapat berpedoman pada peningkatan nutrien di perairan. Untuk itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pada aspek fisiologi dan tingkat keracunannya

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Anderson, D.M. 1994. Red tides. *Scientific American* **271**: 11-16.
- [2] Hallegraft, G.M. 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia* **32**: 79-99.

- [3] Kokinus, J.P. & Anderson, D.M. 1995. Morphological development of resting cysts in culture of the marine dinoflagellates *Lingulodinium polyedrum*. *Palynology* 19: 143-166.
- [4] Guillard, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. Dlm. Smit, W.L. & Chanley, H.M. (edt). *Culture of marine invertebrate animals*, hlm. 29-60. New York: Plenum.
- [5] Tangen, K. 1979. Brown water in the Oslofjord, Norway, in September 1979 caused by the toxic *Prorocentrum minimum* & other dinoflagellates. Dlm. Witek, B., and Plinski, M. (edt.). The first recorded bloom of *Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller in the coastal zone of the Gulf of Gdansk, hlm. 29. Poland: Oceanologia.
- [6] Witek, B. & Plinski, M. 2000. The first recorded bloom of *Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller in the coastal zone of the Gulf of Gdansk. *Oceanologia* 42(1): 29-36.
- [7] Azanza, R.V., Fukuyo, Y., Yap, L.G. & Takayama, H. 2005. *Prorocentrum minimum* bloom and its possible link to a massive fish kill in Bolinao, Pangasinan, Northern Philippines. *Harmful Algae* 4: 519-524
- [8] Sierra-Beltran, A.P., Cortes-Altamirano, R. & Cortes-Lara, M.C. 2005. Occurrences of *Prorocentrum minimum* (Pavillard) in Mexico. *Harmful Algae* 4: 507-517
- [9] Tango, P.J., Magnien, R., Butler, W., Lacouture, R., Sellner, K., Glibert, P., Luckenbach, M., Poukish, C. & Lueckert, C. 2005. Characterization of impacts and potential effects due to *Prorocentrum minimum* blooms in Chesapeake Bay. *Harmful Algae* 4: 525-531.
- [10] Pertola, S., Kuosa, H. & Olsonen, R. 2005. Is the invasion of *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae) related to the nitrogen enrichment of the Baltic Sea?. *Harmful Algae* 4: 481-492
- [11] Grzebyk, D., Denardou, A., Berland, B. & Pouchus, Y.F. 1997. Evidence of a new toxin in the red tide dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *Journal of Plankton Research* 19: 1111-1124.
- [12] Fan, C. & Glibert, P.M. 2005. Effects of light on nitrogen and carbon uptake during a *Prorocentrum minimum* bloom. *Harmful Algae* 4: 629-641
- [13] Usup, G., Pin, C.P., Ahmad, A. & Teen, L.P. 2002. *Alexandrium* (Dinophyceae) species in Malaysia waters. *Harmful Algae* 1: 265-275.
- [14] Berland, B. & Grzebyk, D. 1991. *Prorocentrum minimum*. Dlm. Fan, C., Glibert, P.M. & Burkholder, J.M. (edt.). *Characterization of the affinity for nitrogen, uptake kinetics, and environmental relationship for Prorocentrum minimum in natural blooms and laboratory cultures*, hlm. 284. New York: Elsevier.
- [15] Lomas, M.W. & Glibert, P.M. 2000. Comparison of nitrate uptake, storage, and reduction in marine diatom and flagellates. *J. Phycology* 36: 903-913.