

EKSPLORASI BAKTERI FILOSFER DARI TANAMAN MANGROVE SEBAGAI BAKTERI PROBIOTIK PADA BUDI DAYA UDANG WINDU, *Penaeus monodon*

Muliani, Nurbaya, Arifuddin Tompo, dan Muharijadi Atmomarsono

ABSTRAK

Penelitian bertujuan untuk mengeksplorasi bakteri filofser dari tanaman mangrove sebagai bakteri probiotik pada budi daya udang windu. Penelitian ini terdiri atas beberapa tahapan kerja yaitu: (1) isolasi bakteri filofser dari tanaman mangrove; (2) uji daya hambat bakteri filofser terhadap *V. harveyi*; (3) karakterisasi fisiologi dan biokimia; (4) pertumbuhan bakteri filofser pada beberapa konsentrasi NaCl; (5) pertumbuhan bakteri filofser pada beberapa tingkat salinitas; (6) uji patogenisitas bakteri filofser terhadap pascalarva udang windu; (7) ujiantang bakteri filofser dengan *V. harveyi* dalam wadah pemeliharaan pascalarva udang windu; (8) identifikasi dan disain pohon filogenetik bakteri filofser melalui analisis gen 16S-rRNA. Sebanyak 1.145 isolat bakteri filofser telah diisolasi dari daun mangrove dan dianalisis daya hambatnya terhadap *V. harveyi* baik secara *In Vitro* maupun *In Vivo* dan 8 isolat (1%) di antaranya potensial sebagai bakteri probiotik. Isolat BR53 dan isolat PK446 menghambat pertumbuhan *V. harveyi* secara *In Vitro* dengan daya hambat masing-masing 6,8 mm dan 6,97 mm. Ke-8 isolat bakteri filofser termasuk bakteri gram negatif (kecuali BR883), indol negatif, katalase positif, oksidase positif (kecuali BR931 dan PK446), motil, tidak memproduksi gas dan H₂S, dan MR-VP negatif, tumbuh pada NaCl 10% dan salinitas 0—50 ppt. Bakteri filofser tersebut tidak bersifat patogen terhadap pascalarva udang windu (PL 15) pada konsentrasi 10⁴ cfu/mL. Sintasan larva udang windu tertinggi pada perlakuan yang menggunakan isolat BR931 sebagai probiotik. Namun demikian tidak terdapat perbedaan yang nyata (P>0,05) dengan MR53, PK446, dan BR883, tetapi berbeda nyata (P<0,05) dengan kontrol. Berdasarkan hasil analisis sekuen gen 16S-rRNA, isolat PK446 teridentifikasi sebagai *Kluyvera cryocrescens* dengan tingkat kemiripan 79,09%; BR 883 *Staphylococcus xylosus* dengan tingkat kemiripan 87,22%; BR 931 termasuk *Pseudomonas putida* strain R dengan tingkat kemiripan 87,70%.

ABSTRACT: *Exploration of phylosfer bacteria from mangrove leaves as potential probiotic bacteria in tiger shrimp, Penaeus monodon culture. By: Muliani, Nurbaya, Arifuddin Tompo, and Muharijadi Atmomarsono*

The research was aimed to find the phylosfer bacteria isolated from mangrove leaves as potential probiotic in tiger shrimp culture. The experiment consisted of several steps i.e. (1) isolation of phylosfer bacteria from mangrove leaves; (2)inhibition test of phylosfer bacteria against *V. harveyi*; (3) biochemical and physiological characterization, (4) growth of phylosfer bacteria in several concentration of NaCl; (5) growth of phylosfer bacteria in different salinity; (6) pathogenecity test of phylosfer bacteria to tiger shrimp post larvae, (7) challenge test of phylosfer bacteria against *V. harveyi* in tiger shrimp culture media (8) identification and phylogenetic tree design of phylosfer bacteria by 16S-rRNA gen analysis. Eleven hundred and fourteen isolates of phylosfer bacteria were isolated from mangrove leaves and analyzed for their inhibitory effects against *V. harveyi* both *In Vitro* and *In Vivo* experiments, and 8 isolates (1%) are potential as probiotic bacteria. MR53 and PK446 isolate demonstrated vibriostatic activity with 6.8 mm and 6.97 mm diameter of inhibition zone respectively. Physiological and biochemical characterization of the 8 isolates showed that all of them were gram negative (except BR883), indole negative, MR-VP negative, catalase positive, oxidase positive (excetp BR931 and PK446), motile, and not producing gas and H₂S. These phylosfer bacteria, grow on 10% of NaCl and 0—50 ppt of water salinity. The phylosfer bacteria, at concentration of 10⁴ cfu/mL, were not pathogenic to tiger shrimp. The highest survival rate of tiger shrimp larvae was at treatment using BR931 isolate as probiotic. Although there were not significantly different between MR53, PK446, and BR883, but there were significantly different to control. Based on 16S-rRNA sequencing, PK446 isolate is closely related (79.09%) to DNA sequence of *Kluyvera cryocrescens* 16S-rRNA, BR883 is closely related (87.22%) to DNA sequence of *Staphylococcus xylosus* 16S-rRNA, BR931 is closely related (87.70%) to DNA sequence of *Pseudomonas putida* 16S-rRNA.

KEYWORDS: *phylosfer, probiotic, mangrove, tiger shrimp*

PENDAHULUAN

Beberapa tahun terakhir ini budi daya udang windu di Indonesia mengalami keterpurukan akibat serangan penyakit baik di panti perbenihan maupun di tambak pembesaran yang berakibat pada penurunan produksi. Penurunan produksi udang windu di Indonesia terlihat pada periode 1992—1994 yaitu dari 98.356 MT menjadi 83.193 MT atau sebesar 15% (Anonymous, 1999). Sumber lain menyebutkan bahwa ekspor udang Indonesia ke Jepang mengalami penurunan selama periode 1994—1998 yaitu dari 63.666 MT menjadi 53.411 MT (Ferdouse, 1999).

Serangan penyakit pada budi daya udang windu yang disebabkan oleh bakteri maupun virus tidak hanya terjadi di Indonesia tetapi juga di negara-negara lain seperti Thailand (Jiravanichpaisal *et al.*, 1994; Wongteerasupaya *et al.*, 1995; Chanratchakool & Limswan 1998; Pasharawipas *et al.*, 1998; Ruangpan, 1998; Sukhumsirichart *et al.*, 1998); Taiwan (Kou *et al.*, 1998; Loh *et al.*, 1998; Peng *et al.*, 2001), Filipina (Lavilla-Pitogo *et al.*, 1990 dan 1992; Albaladejo *et al.*, 1998; Loh *et al.*, 1998), India (Karunasagar, 2003; Vaseeharan *et al.*, 2003), Australia (Spann *et al.*, 1995), Jepang (Itami *et al.*, 1998; Kono *et al.*, 2004), dan Amerika (Dhar *et al.*, 2001).

Berbagai penelitian telah dilakukan untuk mendapatkan suatu metode pencegahan dan penanggulangan penyakit pada udang windu antara lain melalui; (1) penggunaan obat-obatan dan antibiotik (Karunasagar *et al.*, 1994); (2) penggunaan tandon dan biofilter (Atmomarsono *et al.*, 1995; Chanratchakool *et al.*, 1995; Muliani *et al.*, 1998a); (3) penggunaan vaksin dan immunostimulan (Itami & Takashi, 1991; Sung *et al.*, 1994; dan Devaraja *et al.*, 1998; Vargas-Albores *et al.*, 1998); dan (4) penggunaan bahan aktif dari sponge dan hydrozoan sebagai antibakteri (Ahmad *et al.*, 1995; Muliani *et al.*, 1996; dan 1998b; dan Suryati *et al.*, 2000).

Penggunaan bakteri yang diisolasi dari berbagai sumber sebagai probiotik juga telah banyak dilaporkan (Tjahyadi *et al.*, 1994; Rosa *et al.*, 1997; Hala, 1999; Hala & Suwanto, 2003; Haryanti *et al.*, 2000; Muliani *et al.*, 2003). Menurut Wang *et al.* (1999), fungsi paling penting dalam penggunaan probiotik adalah mempertahankan kestabilan parameter kualitas air tambak dengan menurunkan bahan organik seperti amonia, gas hidrogen sulfida, dan gas-gas beracun lainnya. Selain itu probiotik juga mengontrol terjadinya *blooming* alga, sehingga dapat menjaga kestabilan nilai pH dalam tambak, menurunkan kadar BOD, dan menjaga ketersediaan oksigen bagi pertumbuhan udang.

Meskipun beberapa bakteri probiotik telah mulai dikembangkan, namun pemanfaatannya belum maksimal karena adanya beberapa kendala seperti optimalisasi pertumbuhan, konsistensi daya hambat atau daya urainya, dan kemampuan beradaptasi. Mengingat bahwa tanaman mangrove merupakan vegetasi alami daerah pertambakan, maka diperlukan eksplorasi bakteri filosfer dari daun mangrove yang dapat dijadikan sebagai sumber bakteri probiotik pada budi daya udang windu. Bakteri filosfer secara umum merupakan bakteri penghuni permukaan daun pada tumbuh-tumbuhan baik yang hidup di dataran tinggi maupun di dataran rendah. Dengan mengisolasi bakteri penghuni permukaan daun mangrove diharapkan ditemukan kandidat probiotik yang dapat digunakan untuk penanggulangan penyakit budi daya udang windu.

BAHAN DAN METODE

Isolasi Bakteri Filosfer

Bakteri filosfer diisolasi dari daun mangrove dan asosiasinya yang dikoleksi dari beberapa lokasi di Sulawesi Selatan. Daun mangrove yang masih segar dimasukkan ke dalam wadah yang telah disterilkan dan selanjutnya dibawa ke laboratorium patologi Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau (BRPBAP), Maros. Isolasi bakteri filosfer dilakukan dengan dua teknik yaitu; (1) teknik replika dan (2) dengan perendaman dalam larutan *buffer* atau larutan fisiologis (NaCl 0,85%). Pada teknik replika daun digunakan media agar King B agar (20 g Pepton; 15 mL Glycerol; 1,5 g K_2HPO_4 ; 1,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 20 g agar; akuades 1 liter) dalam cawan petri atau SWC. Daun mangrove diambil kemudian diletakkan pelan di atas permukaan agar. Dibiarkan sebentar sampai terbentuk replika daun pada media tersebut. Hal yang sama dilakukan untuk permukaan daun yang berlawanan. Selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama 1—2 hari. Koloni yang tumbuh dipisahkan dengan menggunakan media King B yang dimiringkan. Sedangkan pada teknik perendaman digunakan *buffer* fosfat atau larutan garam fisiologis. Daun mangrove dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi *buffer* atau larutan fisiologis, kemudian divortex selama 30 detik supaya bakterinya terlepas dan tersuspensi. Selanjutnya dibuat pengenceran secara berseri (bisa sampai 10^{-2}). Setiap pengenceran diambil 100 mL dan disebar pada media agar King B dalam cawan petri. Selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama 1—2 hari. Koloni bakteri yang tumbuh pada media diidentifikasi berdasarkan bentuk, warna, elevasi, dan ukuran koloni (Austin, 1993; Austin & Austin, 1993; Hadioetomo, 1993; Atlas, 1997; Prescott *et al.*, 2002). Kemudian dimurnikan dengan media agar King B yang

dimiringkan dan selanjutnya diuji daya hambatnya terhadap bakteri *V. harveyi*.

Uji Daya Hambat Bakteri Filosfer terhadap *V. harveyi*

Secara kualitatif

Semua bakteri yang telah diisolasi dari daun mangrove diuji daya hambatnya terhadap *V. harveyi* yang diisolasi dari udang windu, *V. harveyi* ditumbuhkan pada TCBSA selama 24 jam. Koloni tunggal yang tumbuh diambil dengan jarum Ose dan disuspensikan dalam larutan garam fisiologis. Kemudian disebar pada media *Muller Hinton* dalam cawan petri dan dibiakkan selama beberapa menit hingga kering, selanjutnya di atas permukaan agar tersebut diinokulasi dengan bakteri filosfer secara goresan. Biakan bakteri tersebut diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Isolat yang menghambat pertumbuhan *V. harveyi* yang ditandai dengan adanya zona bening di sekitarnya, disimpan untuk selanjutnya diuji lanjut untuk menentukan daya hambat isolat tersebut secara semi kuantitatif menggunakan *paper disk*.

Secara semi kuantitatif

Di atas permukaan media *Muller Hinton Agar Plate* yang telah disebari dengan *V. harveyi* ditaruh *paper disk* steril yang berdiameter 6 mm. Koloni tunggal dari bakteri kandidat biokontrol (biakan 24 jam) disuspensikan dalam larutan garam fisiologis 50 mL dalam tabung *Eppendorf*, kemudian sebanyak 10—20 mL diteteskan pada *paper disk* tersebut. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 28°C selama 24 jam. Setelah itu diukur zona bening yang terbentuk menggunakan mikrometer pada 3 posisi dari setiap *paper disk*, kemudian dirata-ratakan.

Karakterisasi bakteri kandidat biokontrol sifat fisiologi dan biokimia

Semua bakteri filosfer yang menghambat *V. harveyi* dikarakterisasi secara fisiologi dan biokimia yang meliputi; pewarnaan gram, oksidase, katalase, indol, motilitas, MR-VP, produksi H₂S, dan King A dan B (Austin, 1993; Austin & Austin, 1993; Hadioetomo 1993; Alsina & Blanch, 1994; Muir, 1996).

Resistensi terhadap beberapa antibiotik dan pembuatan mutan spontan

Media yang dipakai untuk mempelajari resistensi antibiotik adalah *Muller Hinton Agar* (MH) yang dimodifikasi dengan penambahan antibiotik gentamisin, kloramfenikol, eritromisin, furazolidon, dan

rifampisin dengan konsentrasi masing-masing 25 mg/mL. Isolat bakteri filosfer potensial sebagai probiotik digoreskan pada masing-masing media tersebut, lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 20—24 jam. Respon resistensi dari isolat dapat diketahui dengan mengamati pertumbuhan koloni di atas media tersebut (Hala, 1999). Pembuatan mutan *resisten rifampisin* (Rif^R) dilakukan terhadap semua isolat bakteri filosfer yang potensial sebagai probiotik dengan menggunakan media *Nutrien Broth* (NB) yang disuplementasi dengan rifampisin 50 mg/mL. Kultur sel yang berumur 24 jam sebanyak 500 mL disentrifus dengan kecepatan 300 rpm. Pelet yang terbentuk diresuspensi kembali dalam 100 mL garam fisiologis dan selanjutnya disebar pada media MH dalam cawan petri, lalu diinkubasi pada suhu ruang (28°C—32°C) selama 24 jam. Koloni yang tumbuh pada media MH dalam cawan petri, digoreskan kembali pada media yang sama untuk digunakan dalam uji selanjutnya.

Uji pertumbuhan bakteri filosfer pada beberapa konsentrasi NaCl

Pada tahapan ini dilakukan secara *In Vitro* pada media *Nutrient Broth* dalam cawan labu erlenmeyer. Ke dalam media tersebut ditambahkan NaCl dengan konsentrasi 0%; 0,01%; 0,1%; 1%; dan 10%. Satu ose biakan bakteri filosfer dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi media *Nutrient Broth*, kemudian diinkubasi selama 24—48 jam. Selanjutnya ditumbuhkan kembali pada media King B dalam cawan petri untuk melihat pertumbuhan bakteri filosfer.

Uji pertumbuhan bakteri filosfer pada salinitas yang berbeda

Wadah yang digunakan untuk uji pertumbuhan adalah akuarium kaca berkapasitas 3 L yang telah disterilkan dengan kaporit 150 mg/L dan dinetralsisir dengan *Natrium Thiosulfat* 75 mg/L. Salinitas air yang dicobakan adalah 0 ppt, 10 ppt, 20 ppt, 30 ppt, 40 ppt, dan 50 ppt (untuk melihat kemungkinan aplikasi bakteri tersebut baik pada salinitas rendah di musim hujan maupun salinitas tinggi di musim kemarau). Setiap perlakuan diulang 3 kali. Pengamatan populasi bakteri dilakukan sesuai dengan pola pertumbuhan bakteri tersebut yang telah diketahui melalui uji pendahuluan secara *In Vitro*.

Uji patogenitas bakteri filosfer terhadap pascalarva udang windu

Semua peralatan dan air laut yang digunakan untuk uji patogenitas didisinfeksi dengan merendam dalam larutan kaporit 150 mg/L kurang lebih 3 hari, kemudian dinetralsisir dengan penambahan *Natrium Thiosulfat*

dengan konsentrasi 75 mg/L. Selanjutnya dicuci dengan air yang juga telah disterilkan dengan kaporit dan dinetralsir dengan *Natrium Thiosulfat* dengan konsentrasi yang sama yaitu 150 mg/L dan 75 mg/L.

Hewan uji yang digunakan berupa pascalarva udang windu PL15. Sebelum digunakan larva udang terlebih dahulu diadaptasikan selama 3—4 hari untuk menyesuaikan salinitas media pemeliharaan dengan salinitas asal larva udang.

Bakteri filofser yang potensial sebagai probiotik selanjutnya diuji patogenisitasnya terhadap pascalarva udang windu. Satu ose dari masing-masing isolat ditumbuhkan dalam media NB secara terpisah. Kultur ditempatkan pada inkubator bergoyang selama 24 jam pada suhu ruang. Selanjutnya diuji patogenisitasnya terhadap larva udang windu pada konsentrasi 10^4 cfu/mL (Hala, 1999) secara perendaman (Hameed, 1995). Wadah yang digunakan untuk uji patogenisitas adalah akuarium kaca berkapasitas 3 L yang telah disterilkan dengan kaporit 150 mg/L dan dinetralsir dengan *Natrium Thiosulfat* 75 mg/L. Setiap wadah diisi air laut steril dengan salinitas 20 ppt sebanyak 2 L dan ditebari dengan pascalarva udang sebanyak 30 ekor/wadah. Untuk menjaga ketersediaan oksigen, wadah pemeliharaan udang dilengkapi dengan aerasi dan untuk mempertahankan suhu, wadah ditempatkan pada ruang yang terkontrol dan ditutup dengan plastik hitam. Pemberian pakan dilakukan sebanyak dua kali per hari sebanyak 10% dari bobot tubuh. Patogenisitas bakteri filofser diamati melalui kematian pascalarva udang setelah 48 jam perendaman dan dibandingkan dengan kontrol (tanpa infeksi bakteri filofser).

Uji Tantang Bakteri *V. harveyi* dengan Bakteri Filofser

Uji tantang *V. harveyi* dengan bakteri filofser secara *In Vivo* dilakukan di Laboratorium Basah Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau (BRPBAP), Maros. Penelitian dilakukan menggunakan rancangan acak lengkap dengan tiga kali ulangan. Kepadatan bakteri *V. harveyi* dibuat menjadi 10^7 cfu/mL, dan bakteri filofser dibuat menjadi 10^4 cfu/mL. Wadah yang digunakan untuk uji tantang secara *In Vivo* adalah stoples kaca berkapasitas 3 L yang telah didesinfeksi dengan kaporit 150 mg/L dan dinetralsir dengan *Natrium Thiosulfat* 75 mg/L. Setiap wadah diisi air laut steril dengan salinitas 20 ppt sebanyak 2 L. Suspensi bakteri filofser dimasukkan ke dalam wadah pemeliharaan pascalarva udang windu dua jam sebelum udang dimasukkan. Setelah kokultivasi dengan larva udang sebanyak 30 ekor/wadah selama 6 jam, *V. harveyi* sebagai patogen selanjutnya dimasukkan ke dalam wadah pemeliharaan (Hala, 1999). Pengamatan sintasan pascalarva udang windu

dilakukan 96 jam perendaman. Untuk mengetahui perbedaan sintasan pascalarva udang windu, maka data dianalisis ragam dan dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (Steel & Torrie, 1981).

Identifikasi dan Disain Pohon Filogenetik Bakteri Filofser melalui Analisis Gen 16S-rRNA

Untuk menentukan identitas isolat bakteri filofser yang menghambat pertumbuhan *V. harveyi* dan potensial sebagai bakteri probiotik berdasarkan sekuen 16S-rRNA, maka dilakukan analisis yang meliputi beberapa tahapan sesuai dengan metode yang dikemukakan oleh Marchesi *et al.* (1998) dan telah dimodifikasi oleh Suwanto *et al.* (2000) yaitu meliputi ekstraksi DNA, amplifikasi gen 16S-rRNA dengan PCR, *gene clean* dengan metode *glass milk*, *Cycle sequencing* dengan metode *BigDye*, presipitasi DNA, dan sekuensing dengan mesin *Sequenser*.

HASIL DAN BAHASAN

Telah diperoleh sedikitnya 1.145 isolat bakteri filofser yang diisolasi dari daun mangrove. Berdasarkan hasil penapisan terhadap ke-1.145 isolat tersebut, 8 isolat (1%) dari total isolate, merupakan isolate potensial sebagai bakteri probiotik dan 2 isolat di antaranya menghambat *V. harveyi* secara *In vitro*. Sejauh ini belum ada laporan tentang potensi bakteri filofser dari daun mangrove sebagai bakteri probiotik, namun demikian fungsi mangrove sebagai bioremediasi dan biofilter pada budi daya udang windu telah dilaporkan (Ahmad *et al.*, 2001). Lain halnya dengan bakteri laut, beberapa peneliti telah melaporkan potensinya sebagai sumber bakteri probiotik pada komoditas perikanan. Tjahjadi *et al.* (1994) melaporkan bahwa dari 45 isolat bakteri dari air laut dan air pemeliharaan larva udang windu, 8 di antaranya diuji daya hambatnya secara *in vitro* terhadap pertumbuhan *V. harveyi* dan 3 atau 6,7% di antaranya potensial menghambat pertumbuhan *V. harveyi*. Rosa *et al.* (1997) juga telah mengisolasi 125 isolat bakteri dari air laut, air tambak, air pemeliharaan larva, serta tubuh udang dan 15 atau 12% di antaranya mempunyai daya hambat terhadap perkembangan *V. harveyi*. Sedangkan Haryanti *et al.* (2000) telah mengisolasi sedikitnya 273 isolat bakteri laut dan 3 atau 1% di antaranya memperlihatkan hambatan terhadap pertumbuhan *V. harveyi* secara *In Vitro*. Muliani *et al.* (2003) telah mengisolasi sedikitnya 603 isolat bakteri laut dan 2,5% di antaranya menghambat pertumbuhan *V. harveyi* secara *In Vitro* dan *In Vivo*.

Karakteristik morfologi kedelapan isolat bakteri filofser yang diisolasi dari daun mangrove dan potensial sebagai bakteri probiotik disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik secara morfologi bakteri filosfer dari daun mangrove yang potensial sebagai probiotik pada budi daya udang windu

Table 1. *Morfological characterization of phylosfer bacteria as potencial probiotic in tiger shrimp culture*

Kode isolat (Isolate Code)	Asal (Source)	Ciri-ciri koloni (<i>Colony characteristics</i>)			
		Bentuk/Ukuran (Shape/Size)	Tepian (Margin)	Elevasi (Elevation)	Warna (Color)
MR53	Maros	Tak beraturan <i>Irregular</i>	Bergerigi <i>Erose</i>	Cembung <i>Pulvinate</i>	Putih (<i>white</i>)
BR931	Baru	Bundar/Kecil <i>Circular/Small</i>	Licin <i>Entire</i>	Cembung <i>Pulvinate</i>	Orange (<i>Orange</i>)
PK446	Pangkep	Bundar/Sedang <i>Circular/Medium</i>	Licin <i>Entire</i>	Cembung <i>Pulvinate</i>	Kuning (<i>Yellow</i>)
BL583	Bulukumba	Bundar/Besar <i>Circular/Big</i>	Licin <i>Entire</i>	Timbul <i>Convex</i>	Putih kekuningan <i>Yellow white</i>
BR878	Baru	Tak beraturan <i>Irregular</i>	Licin <i>Entire</i>	Datar <i>Flat</i>	Putih kekuningan <i>Yellow white</i>
BR882	Baru	Tak beraturan <i>Irregular</i>	Licin <i>Entire</i>	Datar <i>Flat</i>	Hijau berpendar <i>Green fluorescence</i>
BR883	Baru	Tak beraturan <i>Irregular</i>	Licin <i>Entire</i>	Datar <i>Flat</i>	Hijau berpendar <i>Green fluorescence</i>
BR919	Baru	Tak beraturan <i>Irregular</i>	Licin <i>Entire</i>	Cembung <i>Pulvinate</i>	Putih kekuningan <i>Yellow white</i>

Hasil Uji Daya Hambat Bakteri Filosfer terhadap *Vibrio harveyi*

Hasil uji daya hambat bakteri filosfer terhadap *V. harveyi* menunjukkan bahwa ada dua isolat yang memiliki daya hambat yang cukup potensial terhadap *V. harveyi* yaitu isolat MR53 (6,8 mm), dan PK446 (6,97 mm). Daya hambat kedua jenis bakteri terhadap *V. harveyi* lebih rendah dibanding dengan daya hambat bakteri laut yang telah dilaporkan sebelumnya yaitu isolat BL542 dengan zona hambatan terbesar (11,5 mm), dan isolat BL546 dan BL547 yang masing-masing sebesar 11,1 mm (Muliani *et al.*, 2003).

Karakterisasi Bakteri Filosfer

Sifat fisiologi dan biokimia

Hasil uji fisiologi dan biokimia menunjukkan bahwa semua bakteri filosfer termasuk bakteri gram negatif, kecuali isolat BR883 bersifat gram positif, katalase positif, motil, dan indol negatif dan pada umumnya oksidase positif (kecuali BL 931 dan PK446), tidak menghasilkan gas dan H₂S, Uji MR-PV negatif, King A, dan King B positif.

Resistensi terhadap antibiotik

Hasil uji resistensi terhadap beberapa macam antibiotik dari ke 8 isolat bakteri filosfer disajikan pada Tabel 2.

Pada Tabel 2, terlihat bahwa semua isolat bakteri filosfer sensitif terhadap rifampisin (kecuali BR931), resisten terhadap gentamicin, resisten terhadap furazolidon (kecuali MR53 dan BL 583), resisten terhadap kloramfenicol (kecuali BL583 dan BR919) dan resisten terhadap eritromisin (kecuali isolat BL583). Hal ini menunjukkan bahwa secara alami bakteri dapat bersifat resisten terhadap suatu antibiotik.

Sifat resistensi tersebut diperlukan oleh suatu mikroorganisme untuk mempertahankan sintasannya di alam. Menurut Chythanya *et al.* (1999), secara alami beberapa jenis mikroorganisme memiliki gen penyandi antibiotik yang dapat melindungi dirinya dari serangan antibiotik dari luar. Sifat resistensi terhadap suatu jenis antibiotik dari suatu bakteri perlu diketahui sebelum ditetapkan jenis antibiotik yang akan digunakan sebagai penanda terhadap bakteri tersebut. Hal ini akan memudahkan untuk menyeleksi bakteri tersebut dari bakteri yang secara alami sensitif terhadap antibiotik yang digunakan.

Uji Pertumbuhan Bakteri Filosfer terhadap Beberapa Konsentrasi NaCl

Pertumbuhan ke-8 isolat pada kadar NaCl yang berbeda disajikan pada Tabel 3. Dari tabel tersebut terlihat bahwa pada umumnya bakteri filosfer masih mampu tumbuh pada konsentrasi NaCl 10%. Hal ini

Tabel 2. Pertumbuhan bakteri filofser pada media Muller Hinton yang dibubuhi beberapa jenis antibiotik 25 mg/mL

Table 2. Growth of phylosfer bacteria on Muller Hinton Agar supplemented with 25 mg/mL of antibiotics

Kode isolat <i>Isolate code</i>	Antibiotik (<i>Antibiotics</i>)				
	Rf	Gm	Fz	Ch	Em
MR53	-	+	-	+	+
BR931	+	+	+	+	+
PK446	-	+	+	+	+
BL583	-	+	-	-	-
BR878	-	+	+	+	+
BR882	-	+	+	+	+
BR883	-	+	+	+	+
BR919	-	+	+	-	+

Keterangan: Rf = Rifampisin, Gm = Gentamisin, Fz = Furazolidon, Ch = Chlorampenicol, Em = Eritromisin, (-) = sensitif, (+) = resisten

Note: Rf = Rifampisin, Gm = Gentamisin, Fz = Furazolidon, Ch = Chlorampenicol, Em = Eritromisin, (-) = sensitive, (+) = resistant

Tabel 3. Pertumbuhan bakteri filofser pada beberapa konsentrasi NaCl

Table 3. Growth of phylosfer bacteria on several concentrations of NaCl

Kode isolat <i>Isolate code</i>	Konsentrasi NaCl (%) <i>NaCl concentration (%)</i>				
	0	0.01	0.1	1	10
MR53	+	+	+	+	+
PK446	+	+	+	+	+
BL583	+	+	+	+	+
BR882	+	+	+	+	+
BR883	+	+	+	+	+
BR878	+	+	+	+	+
BR919	+	+	+	+	+
BR931	+	+	+	+	+

menunjukkan kemungkinan penggunaannya sebagai bakteri probiotik pada budi daya air payau.

Uji Pertumbuhan Bakteri Filosfer pada Salinitas yang Berbeda

Dari delapan isolat bakteri filofser yang telah diuji pertumbuhannya terhadap beberapa konsentrasi NaCl, 4 isolat di antaranya diuji lanjut untuk mengetahui toleransinya terhadap beberapa tingkatan salinitas (Tabel 4). Hasil penelitian menunjukkan bahwa keempat isolat tersebut tumbuh pada semua tingkatan salinitas yang diujikan (0—50 ppt), meskipun ada kecenderungan beberapa isolat tumbuh optimal pada kisaran salinitas 20—40 ppt. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri filofser yang diisolasi dari daun mangrove bersifat toleran terhadap kisaran salinitas

yang lebar. Dengan demikian bakteri filofser yang diisolasi dari daun mangrove memiliki peluang yang sangat besar untuk dikembangkan sebagai probiotik baik pada budi daya air tawar, air payau, maupun laut.

Uji Patogenisitas Bakteri Filosfer terhadap Larva Udang Windu

Hasil uji patogenisitas 4 isolat bakteri filofser terhadap pascalarva udang windu pada konsentrasi (10^4 cfu/mL) disajikan pada Tabel 5.

Dari Tabel 5 terlihat bahwa sintasan pascalarva udang windu tertinggi pada perlakuan yang menggunakan BR931 dan BR883, kemudian berturut-turut MR53, PK446, dan kontrol. Dari data tersebut terlihat bahwa pada umumnya bakteri filofser tidak bersifat patogen terhadap larva udang windu, karena

Tabel 4. Rata-rata pertumbuhan bakteri filofosfer pada salinitas yang berbeda setelah 24 jam
 Table 4. Growth rate of phylosfer bacteria on different salinities after 24 hours

Kode isolat <i>Isolate code</i>	Salinitas (ppt) <i>Salinity (ppt)</i>					
	0	10	20	30	40	50
MR53	2.9 x 10 ³	3.1 x 10 ⁴	3.3 x 10 ³	1.9 x 10 ³	8.8 x 10 ²	1.2 x 10 ²
PK446	4.0 x 10 ³	4.3 x 10 ²	5.3 x 10 ³	2.3 x 10 ³	9.7 x 10 ²	8.4 x 10 ²
BR882	5.9 x 10 ⁴	7.7 x 10 ³	9.4 x 10 ⁴	6.8 x 10 ⁴	1.7 x 10 ⁵	7.3 x 10 ⁴
BR931	2.3 x 10 ⁵	5.2 x 10 ³	9.3 x 10 ⁵	4.1 x 10 ⁵	1.2 x 10 ⁵	6.2 x 10 ⁵

sintasan pascalarva udang windu masih lebih tinggi dibanding dengan kontrol. Namun sintasan ini secara statistik tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P>0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa bakteri filofosfer yang diisolasi dari daun mangrove dapat dijadikan probiotik pada budi daya udang windu dengan mengaplikasikan langsung sel utuh dari bakteri tersebut.

Sintasan Pascalarva Udang Windu yang Diuji Tantang dengan *V. harveyi*

Hasil pengamatan terhadap sintasan pascalarva udang windu PL 15 pada ujiantang secara *In Vivo* antara bakteri filofosfer dengan *V. harveyi* dapat dilihat pada Tabel 6.

Dari tabel tersebut terlihat bahwa sintasan pascalarva udang windu tertinggi pada perlakuan yang menggunakan isolat BR931 sebagai probiotik, kemudian berturut-turut MR53, PK446, BR883, dan terendah pada kontrol (tanpa pemberian bakteri filofosfer). Hasil uji statistik menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata ($P<0,05$) antara sintasan udang pada perlakuan yang menggunakan isolat BR931 dengan kontrol, namun tidak ada perbedaan yang nyata ($P>0,05$) antara sintasan udang

yang menggunakan isolat BR931 dengan isolat isolat MR53, PK446, dan BR883, demikian pula antara isolat MR53, PK446, dan BR883 dengan kontrol tidak berbeda nyata ($P>0,05$). Tingginya sintasan larva udang windu pada perlakuan yang menggunakan isolat BR931 dibanding perlakuan lainnya diduga karena isolat ini tergolong dalam kelompok bakteri *Pseudomonas putida* Strain R (berdasarkan hasil sekuen 16S-rRNA) dengan tingkat kemiripan 87,70% (data EMBL/GenBank/DDBJ *database*). Kelompok bakteri ini banyak digunakan sebagai bakteri probiotik dan telah dijual bebas di pasaran. Kelompok bakteri ini selain sebagai bakteri pengurai juga beberapa di antaranya bersifat antagonisme terhadap bakteri lain. Sebagaimana yang telah dilaporkan oleh Gram *et al.* (1999), bahwa *Pseudomonas fluorescens* dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio anguillarum* baik secara *In Vitro* maupun *In Vivo*.

Disain Pohon Filogenetik

Selain isolat BR931 dua isolat lainnya (PK446 dan BR883) juga diidentifikasi berdasarkan sekuen 16S-rRNANYA. Berdasarkan hasil analisis sekuen gen 16S-rRNA dari kedua isolat tersebut menunjukkan bahwa isolat PK446 teridentifikasi sebagai *Kluyvera*

Tabel 5. Sintasan pascalarva udang windu (%) setelah 48 jam direndam dalam larutan bakteri filofosfer yang berbeda

Table 5. Survival rate of tiger shrimp post larvae (%) 48 hours after exposed to different phylosfer bacteria

Kode isolat <i>Isolate code</i>	Sintasan pascalarva udang windu (%) <i>Survival rate of tiger shrimp larvae (%)</i>
MR53	85.55 ^a
PK446	84.45 ^a
BR883	86.67 ^a
BR931	86.67 ^a
Kontrol (<i>Control</i>)	82.22 ^a

Keterangan (*Note*): Angka yang diikuti huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata (*Number followed by different alphabet on the same column show the significant differences*)

Tabel 6. Pengaruh bakteri filosfer terhadap sintasan pascalarva udang windu yang diuji tantang dengan *V. harveyi* selama 96 jam pada salinitas 20 ppt

Tabel 6. Effect of phylosfer bacteria on survival rate of tiger shrimp post larvae 96 hours after challenged with *V. harveyi* at water salinity of 20 ppt

Kode Isolat Code isolates	Sintasan pascalarva udang windu (%) Survival rate of tiger shrimp post larvae (%)
MR53	87.77 ^{ab}
PK446	82.22 ^{ab}
BR883	82.22 ^{ab}
BR931	94.44 ^a
Kontrol (Control)	73.33 ^b

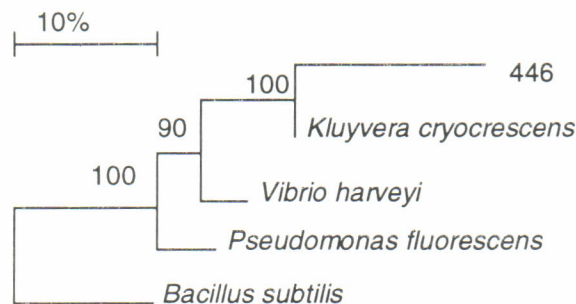
Keterangan (Note): Angka yang diikuti huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata (Number followed by different alphabet on the same column show the significant differences)

cryocrescens dengan tingkat kemiripan 79,11%; BR 883 *Staphylococcus xylosus* dengan tingkat kemiripan 87,22% (berdasarkan data EMBL/GenBank/DBJ database).

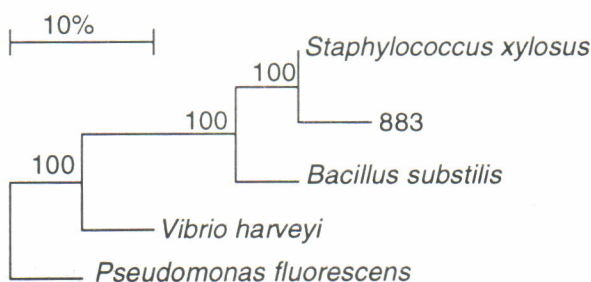
Staphylococcus sp. termasuk kelompok bakteri gram positif yang bersifat tidak motil dan tidak berspora, ukurannya berkisar 0,9—1,3 mm, berbentuk coccus berantai menyerupai spiral *facultative anaerobik*, juga biasa digunakan sebagai bakteri probiotik pengurai bahan organik, sedangkan *Kluyvera* sp. termasuk bakteri gram negatif, MR positif, VP negatif, indol dan citrate positif, membentuk 2-

oxoglutarat dari glukosa (Singleton & Sainsbury, 1999). Pemanfaatan bakteri ini sebagai bakteri probiotik sampai saat ini belum dilaporkan, bakteri ini termasuk bakteri penghuni daun dan sering diidentifikasi sebagai penyebab penyakit pada sayur-sayuran seperti sawi dan kubis.

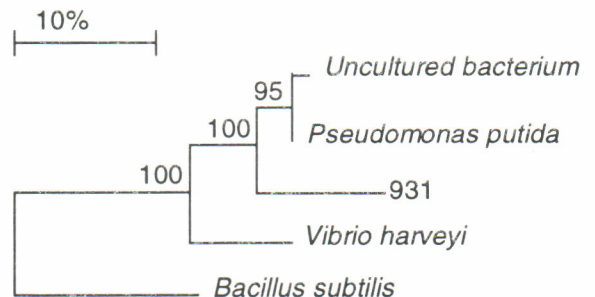
Hasil analisis gen 16S-rRNA dari isolat-isolat tersebut selanjutnya dibuat pohon filogenetik untuk mengetahui kedekatan kekerabatan bakteri lain dengan membandingkan 672 basa-basa DNA. Pohon filogenetik tersebut dapat dilihat pada Gambar 1a—1c.



Gambar 1a. Pohon filogenetik isolat PK446



Gambar 1b. Pohon filogenetik isolat BR883



Gambar 1c. Pohon filogenetik isolat BR931

KESIMPULAN

Delapan isolat bakteri filoster yang diisolasi dari daun mangrove potensial sebagai bakteri probiotik pada budi daya udang windu dan bakteri tersebut tidak bersifat patogen terhadap pascalarva udang windu (PL15) pada konsentrasi 10^4 cfu/mL.

Sintasan larva udang windu tertinggi pada perlakuan yang menggunakan isolat BR931 sebagai probiotik, namun tidak ada perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) dengan perlakuan yang lainnya tetapi berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan kontrol.

Berdasarkan hasil analisis sekuen gen 16S-rRNA, isolat PK446 teridentifikasi sebagai *Kluyvera cryocrescens* dengan tingkat kemiripan 79,11%; BR 883 *Staphylococcus xylosus* dengan tingkat kemiripan 87,22%; BR 931 termasuk *Pseudomonas putida* strain R dengan tingkat kemiripan 87,70%.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, T. and M. Mangampa. 2000. The use of mangrove stands for bioremediation in a close shrimp culture system. In Hardjito L. (Ed.). *Proceedings of International Symposium on Marine Biotechnology*. Indonesia, p. 114—122.
- Ahmad, T., E. Suryati, and Muliani. 1995. Screening sponge for bactericide to be use in shrimp culture. *Ind. Fish. Res. J.* 1: 1—10.
- Ahmad, T., M. Tjaronge, and F. Cholik. 2001. The use of mangrove stands for shrimp pond waste-water treatment. *Ind. Fish. Res. J.* 7 (1): 7—15.
- Albaladejo, J.D., L.M. Tapay, V.P. Migo, C.G. Alfafara, J.R. Somga, S.L. Mayo, R.C. Miranda, K. Natividal, F.O. Magbanua, T. Itami, M. Matsumura, and E.C.B. Nadala, P. C. 1998. Screening for shrimp viruses in the Philippines. In Flegel TW. (Ed.). *Advances in Shrimp Biotechnology*. BIOTEC. The National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand, p. 252—253.
- Alsina, M. and A.R. Blanch. 1994. A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *J. Appl. Bacteriol.* 76: 79—85.
- Anonimus. 1999. *Aquaculture Production Statistics*. Food and agriculture organization of The United Nation. Roma, 4 pp.
- Atlas, R.M. 1997. *Hand Book of Microbiologicak Media*. 2nd edition. CRC Press. Boca Raton. New York. London. Tokyo, 1,706 pp.
- Atomarsono, M., Muliani, dan S. Ismawati. 1995. Prospek penggunaan tandon pada budi daya udang windu. *Makalah disajikan pada Ekspose Hasil Penelitian di Instalasi Pengkajian Teknologi Pertanian Wonocolo Surabaya, 2-4 Juli 1995*, 10 pp.
- Austin, B. 1993. *Methods in Aquatic Bacteriology*. John Wiley and Sons. Chichester. New York. Brisbane. Toronto. Singapore, 425 pp.
- Austin, B. and D.A. Austin. 1993. *Bacterial Fish Pathogens. Disease in farmed and wildfish*. 2nd edition. New York. London. Toronto. Sydney. Tokyo. Singapore, 384 pp.
- Chythanya, R., D.K Nayak, and M.N. Venugopal. 1999. Antibiotic resistance in aquaculture. News from around the world. *Infofish International*, 6: 30—32.
- Chanratchakool, P. and C. Limsuwan. 1998. Application of PCR and Formalin treatment to prevent White Spot Disease in Shrimp. In Flegel TW. (Ed.). *Advances in Shrimp Biotechnology*. BIOTEC. The National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand, p. 287—289.
- Chanratchakool, P., J.F. Turnbull, S.F. Smith, and C. Limsuwan. 1995. *Health Management in Shrimp Ponds*. 2nd Edition. Aquatic Animal Health Research Institute. Departement of Fisheries. Kasetsart University Campus. Bangkok, 111 pp.
- Devaraja, T.N., S.K.Otta, G. Shubha, I. Karunasagar, P. Tauro, and I. Karunasagar. 1998. Immunostimulation of shrimp through oral administration of *Vibrio* bacteri and yeast glucan. In Flegel TW. (Ed.) *Advances in Shrimp Biotechnology*. BIOTEC. The National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand, p. 167—170.
- Dhar, A.K., M.M. Roux, and K.R. Klimpel. 2001. Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and White spot Syndrome Virus in shrimp using Real-Time quantitative PCR and SYBR green chemistry. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 2,835—2,845.
- Ferdouse, F. 1999. Japanese and other Asian markets for shrimp-an overview. News from around the world. *Infofish International*, 6: 23—28.
- Gram, L., J. Melchiorson, B. Spanggaard, I. Huber, and T.F. Nielsen. 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a Possible probiotic treatment of fish. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 969—973.
- Hadioetomo, R.S. 1993. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek: Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium*. PT Gramedia, Jakarta, p. 62—68.
- Hala, Y. 1999. *Penggunaan Gen Penanda Molekular untuk Deteksi Pelekatan dan Kolonisasi Vibrio harveyi pada Larva Udang Windu (Penaeus monodon)* [Disertasi]. Program Pascasarjana. IPB. Bogor, 91 pp.
- Hala, Y. dan A. Suwanto. 2003. Ekspresi Gen *inaZ* pada *Vibrio* sp. untuk memantau pelekatan bakteri pada larva udang. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*, 8: 13—18.
- Hameed, A.S.S. 1995. Susceptibility of three *Penaeus* species to a *Vibrio campbelli*-like bacterium. *J. World Aqua. Soc.*, 26: 315—319.
- Haryanti, K. Sugama, S. Tsumura, and T. Nishijima. 2000. Vibriostatic bacterium isolated from seawater: Potentiality as probiotic agent in the rearing of *Penaeus monodon* larvae. *Ind. Fish. Res. J.*, 6: 26—32.

- Itami, T., M. Maeda, N. Suzuki, K. Tokushige, A. Nakagawa, O. Henning, M. Kondo, J. Kasornchandra, I. Hirono, T. Aoki, Kusuda., and Y. Takahashi. 1998. Possible prevention of White Spot Syndrome (WSSV) in kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan. In Flegel TW. (Ed.). *Advances in Shrimp Biotechnology*. BIOTEC. The National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand, p. 291—295.
- Itami, T. and Y. Takahashi. 1991. Survival of larval giant tiger prawns *Penaeus monodon* after addition of killed vibrio cell to a microencapsulated diet. *J. Aqua. Anim. Health*, 3: 151—152.
- Jiravanichpaisal, P., T. Miyazaki, C. Limsuwan. 1994. Histopathology, biochemistry, and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger prawn *Penaeus monodon*. *J. Aqua. Anim. Health*, 6: 27—35.
- Karunasagar, I. 2003. *Application of Polymerase Chain Reaction for Detection of Shrimp Pathogens in India*. Department of Fishery Microbiology, University of Aquacultural Sciences, College of Fisheries, Mangalore-575 002, India, 2 pp.
- Karunasagar, I., R. Pai, G.R. Malathi, and I. Karunasagar. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*; 128: 203—209.
- Kono, T., R. Savan, and T. Itami. 2004. Detection of white spot syndrome virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol. Methods*, 115: 59—65.
- Kou, G.H., S.E. Peng, Y.L. Chiu, and C.F. Lo. 1998. Tissue distribution of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp and crabs. In Flegel TW. (Ed.). *Advances in shrimp biotechnology*. BIOTEC. The National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand, p. 267—271.
- Lavilla-Pitogo, C.R., L.L. Baticados, E.R. Cruz Lacierda, and L.D. de la Pena. 1990. Occurrence of luminous bacterial diseases of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. *Aquaculture*, 91: 1—13.
- Lavilla-Pitogo, C.R., L.J. Albright, M.G. Paner, N.A. Sunaz. 1992. Studies on the source of luminescent *Vibrio harveyi* in *Penaeus monodon* hatcheries. In Shariff IN, Subasinghe RP, Arthur R.J. (Eds.), *Diseases in Asia Aquaculture*. Fish Health Section Asian Fisheries Society, Manila. Philippines, p. 157—164.
- Loh, P.C., E. Cesar, J.R.B. Nadala, L.M. Tapay, and Y. Lu. 1998. Recent developments in Immunologically-Based and cell culture protocols for the specific detection of shrimp viral pathogens. In Flegel TW. (Ed.). *Advances in Shrimp biotechnology*. BIOTEC. The National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand, p. 255—259.
- Marchesi, J., R.T. Sato, A.J. Weightman, T.A. Martin, J.C. Fry. S.J. Hiom, and W.G. Wade. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S-rRNA. *Appl. Environ. Microbiol*, 64: 795—799.
- Muir, P. 1996. *Identification of Vibrio and Pseudomonas bacteria*. Departement of Microbiology, Biomedical and Tropical Veterinary Science. James Cook University of North Queensland. Australia, 6 pp.
- Muliani, M. Atmomarsono, M.I. Madeali. 1998a. Pengaruh penggunaan kekerangan sebagai biofilter terhadap kelimpahan dan komposisi jenis bakteri pada budidaya udang windu (*Penaeus monodon*) dengan sistem resirkulasi air. *J. Pen. Per. Indonesia*, 3: 54—61.
- Muliani, E. Suryati, dan T. Ahmad. 1996. Peluang pemanfaatan bioaktif sponge sebagai bakterisida. *Makalah disampaikan pada Temu Ilmiah Nasional Bidang Veteriner*. Bogor, 9 pp.
- Muliani, E. Suryati, dan T. Ahmad. 1998b. Penggunaan ekstrak spons untuk penanggulangan bakteri *Vibrio* spp. pada udang windu *Penaeus monodon*. *J. Pen. Perik. Ind.*, 1: 108—115.
- Muliani, A. Suwanto, dan Hala. 2003. Isolasi dan karakterisasi bakteri asala laut Sulawesi untuk biokontrol penyakit vibriosis pada larva udang windu (*Penaeus monodon* Fab.). *Hayati*, 10: 6—11.
- Pasharawipas, T., S. Sriurairatana, S. Direkbusarakom, Y. Donayadol, S. Thaikua, L. Ruangpan, and T.W. Flegel. 1998. Luminous *Vibrio harveyi* associated with tea brown gill syndrome in black tiger shrimp. In Flegel TW. (Ed.). *Advances in Shrimp Biotechnology*. BIOTEC. The National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand, p. 213—216.
- Peng, S.E., C.F. Lo, S.C. Lin, Chen, Y.S. Chang, K.F. Liu, M.S. Su, and G.H. Kou. 2001. Performance of WSSV-infected and WSSV-negative *Penaeus monodon* postlarvae in culture ponds. *Dis. Aquat. Org.*, 46: 165—172.
- Prescott, L.M., J.P. Harley, and D.A. Klein, 2002. *Microbiology*. 5th edition. Mc Graw Hill. Boston Burr Ridge, IL Dubuque, IA Madison, WI New York, San Fransisco, Bangkok, Bogota, Caracas, Kualalumpur, Lisbon, London, Madrid, Mexico City, Milan, Montreal, Newdelhi, Santiago, Seoul, Singapore, Sydney, Taipei, Toronto, 1,0026 pp.
- Rosa, D., Zafran, I. Tufik, dan M.A. Girsang. 1997. Pengendalian *Vibrio harveyi* secara biologis pada larva udang windu (*Penaeus monodon*): I. *Isolasi Bakteri Penghambat*. *J. Penel. Perik. Ind.*, 3: 1—10.
- Ruangpan, L. 1998. Luminous bacteria associated with shrimp mortality. In Flegel, T.W. (Ed.). *Advances in Shrimp Biotechnology*. BIOTEC. The National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand, p. 205—211.
- Singleton, P. and D. Sainsbury. 1999. *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*. 2nd edition. A. Wiley-Interscience Publication. John Wiley & Sons. Chichester. New York. Brisbane. Toronto. Singapore, 1018 pp.
- Spann, K.M., J.E. Vickers, and R.J.G. Lester. 1995. Lymphoid organ virus of *Penaeus monodon* from Australia. *Dis. Aquat. Org.*, 23: 127—134.
- Steel, R.G.D. and J.H. Torrie. 1981. *Principles and Procedures of Statistics*. Biometrical Approach (2nd edition). International Student Edition. McGraw-Hill International Book Company, 633 pp.
- Sukhumsirichart, W., C. Wongteerasupaya, V. Boonsaeng, S. Panyim, S. Sriurairatana, B.

- Withyachumnarnkul, and T.W. Flegel. 1998. Genome organization and detection of Hepatopancreatic Parvovirus (HPV) from *Penaeus monodon* in Thailand. In Flegel, T.W. (Ed.). *Advances in Shrimp biotechnology*. BIOTEC. The National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand, p. 261—262.
- Sung, H.H., G.H. Kou, Y.L. Song. 1994. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathol.*, 1: 11—17.
- Suryati, E., Rosmiati, W. Moka, and Y. Hala. 2000. Hydrozoan *Aglaophenia* sp. Bioactive Substance analysis for bactericide. *Ind. Fish. Res. J.*, 6:55—61.
- Suwanto, A., Yogiara, D. Suryanto, I. Tan, dan E. Puspitasari. 2000. Selected protocols. *Training Course on Advances in Molecular Biology Techniques to Assess Microbial Diversity*. Bogor, 28 pp.
- Tjahjadi, M.R., S.L. Angka, and A. Suwanto. 1994. Isolation and evaluation of marine bacteria for biocontrol of luminous bacterial diseases in tiger shrimp larvae (*Penaeus monodon* Fab.). *Aspac. J. Mol. Biol. Biotechnol.*, 2: 347—352.
- Vargas-Albores, F., J. Hernandez-Lopez, T. Gollas-Galvan, K. Montano-Perez, F. Jimenes-Vega, and G. Yepiz-Plascencia. 1998. Activation of shrimp cellular defence functions by microbial products. In Flegel TW. (Ed.). *Advances in Shrimp Biotechnology* BIOTEC. The National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand, p. 161—166.
- Vaseeharan, B., R. Jayakumar, and P.Ramasamy. 2003. PCR-base detection of white spot syndrome virus in cultured and captured crustaceans in India. *Lett. Appl. Microbiol.*, 37: 443—447.
- Wang, Y.G., O.L. Tan, K.L. Lee, M.D. Hassan, and M. Shariff. 1999. Health management of shrimp during grow-out. News from around the world. *Infofish International*, 4: 30—35.
- Wongteerasupaya, C., S. Sriurairatana, J.E. Vickers, A. Akrajamorn, V. Boonsaeng, S. Panyim, A. Tassanakajon, B. Withyachumnarnkul, and T.W. Flegel. 1995. Yellow-head virus of *Penaeus monodon* is an RNA virus. *Dis.Aquat. Org.*, 22: 45—50.

