

PENGUNAAN BAKTERI PROBIOTIK *Alteromonas* sp. BY-9 DALAM PEMELIHARAAN LARVA UDANG MELALUI PAKAN ALAMI DAN BUATAN

Haryanti¹⁾, Gusti Ngurah Permana²⁾, Sari Budi Moria¹⁾, Nyoman Adiasmara Giri¹⁾, dan Ketut Sugama²⁾

ABSTRAK

Upaya untuk menyederhanakan dan mengefisiensikan penggunaan bakteri strain *Alteromonas* sp. BY-9 melalui pakan alami maupun pakan buatan telah dilakukan. Dalam penelitian ini strain *Alteromonas* sp. BY-9 dibiakkan bersama dengan mikroalga (*Chaetoceros ceratosporum*), sehingga terjadi penempelan sel bakteri pada dinding sel mikroalga (A), dan mencampurkan strain *Alteromonas* sp. BY-9 yang telah dikeringkan dengan pengeringan dingin (*freeze dried*) dalam pakan buatan mikroenkapsulasi (B). Sebagai kontrol digunakan biakan sel segar *Alteromonas* sp. BY-9 (C) dalam pemeliharaan larva udang. Inokulasi strain *Alteromonas* sp. BY-9 pada masing-masing perlakuan sebanyak 10^6 cfu/mL. Tiap perlakuan diulang 4 kali. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa sintasan larva pada PL-10 menunjukkan perbedaan ($P < 0,05$). Sintasan tertinggi diperoleh pada perlakuan penggunaan sel *Alteromonas* sp. BY-9 segar (48,98%) diikuti dengan aplikasi *Alteromonas* sp. BY-9 dalam pakan alami (40,44 %); sedangkan aplikasi dalam pakan buatan hanya mendapatkan sintasan 33,70%. Perkembangan benih antara penggunaan strain *Alteromonas* sp. BY-9 dalam pakan alami dan penggunaan sel segar menunjukkan 1 hari lebih cepat bila dibandingkan dengan aplikasi pakan buatan. Dari hasil uji produk ekstra seluler (ECP) dan keragaan berat molekul DNA dari strain *Alteromonas* sp. BY-9 yang telah diperlakukan pada masing-masing perlakuan, ternyata tidak ada perubahan berat molekul DNA. Dengan demikian peran dan kemampuan bakteri probiotik *Alteromonas* sp. BY-9 disinyalir juga tidak ada penurunan.

ABSTRACT: *Use of Alteromonas sp. BY-9 in microalgae and artificial feed for larval rearing of Penaeus monodon. By: Haryanti, Gusti Ngurah Permana, Sari Budi Moria, Nyoman Adiasmara Giri, and Ketut Sugama*

This experiment aimed to make more efficiently and simply in the use of probiotic Alteromonas sp. BY-9 for rearing of Penaeus monodon shrimp larvae. In this experiment, three treatments were tested i.e. inoculated of Alteromonas sp. BY-9 in axenic clone culture of microalgae Chaetoceros ceratosporum (A), inoculation of lyophilized form of Alteromonas sp. BY-9 in microencapsulated diet (B), and inoculation of fresh cells culture of Alteromonas sp. BY-9 as control (C). Each treatment had 4 replications and density of bacterium inoculated in larval rearing was 10^6 cfu/mL. Result showed that survival rate (SR) of fry at postlarvae-10 stage were significantly different among treatments ($P < 0.05$). The highest survival rates (48.98%) was obtained on the use of fresh cell culture of Alteromonas sp. BY-9, followed by inoculation of Alteromonas sp. BY-9 in microalgae and microencapsulated diet with SR of 40.44 % and 33.70 % respectively. Growth rates of larvae between control and inoculated of Alteromonas sp. BY-9 in microalgae treatments were not significantly different, but development rate on inoculation of Alteromonas sp. BY-9 in microencapsulated diet was 1 day slower than the other treatments. Result of enzymatic activity of Extra Cellular Product (ECP) and genome DNA analyses of Alteromonas sp. BY-9 after treated by different methods did not show any differences among treatments, meaning that ability of Alteromonas sp. BY-9 as biocontrol as well as probiotics after preserved did not change.

KEYWORDS: *Alteromonas BY-9, microalgae, artificial feed, shrimp larvae*

PENDAHULUAN

Program pengembangan budi daya udang yang dikenal dengan Pengembangan Udang Nasional merupakan cerminan dari masih tingginya komoditas udang sebagai andalan di sektor perikanan. Menurut Ditjenkan (1999), diperkirakan pengembang-an areal

pertambakan akan mencapai 380.000 ha hingga tahun 2003 dengan kebutuhan benih udang sekitar 55 milyar per tahun. Untuk memenuhi kebutuhan tersebut diperlukan upaya untuk mengantisipasi faktor-faktor kegagalan produksi di hatcheri, terutama terhadap serangan penyakit pada larva udang.

Penggunaan bahan obat-obatan, antibiotik, atau bahan kimia lainnya banyak diaplikasikan dalam

¹⁾ Peneliti pada Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut, Gondol

²⁾ Pusat Riset Perikanan Budidaya

produksi benih udang untukantisipasi serangan penyakit di hatcheri. Namun hasil yang diperoleh seringkali masih tetap di bawah perkiraan jumlah yang ditargetkan atau bahkan terjadi mortalitas massal. Upaya pengembangan bakteri sebagai probiotik maupun kontrol biologi dalam usaha pembenihan ikan, krustase, dan kekerangan telah banyak dikembangkan.

Hasil yang diperoleh dari Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut, Gondol-Bali, menunjukkan bahwa strain bakteri *Alteromonas* sp. BY-9 telah dapat diaplikasikan sebagai probiotik dan kontrol biologi dalam pemeliharaan larva udang windu *Penaeus monodon*. Dari beberapa penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa pemanfaatan bakteri *Alteromonas* sp. BY-9 dapat meningkatkan sintasan hingga mencapai 30%—60%, pertumbuhan yang lebih cepat dan mutu benur yang lebih baik serta dapat menekan penyakit *Vibrio* patogen (*Luminescent vibriosis*) hingga populasi sangat rendah atau bahkan tidak ada dalam media pemeliharaan larva maupun dalam tubuh udang (Haryanti *et al.*, 1997a; Haryanti *et al.*, 1997b; Haryanti *et al.*, 1998; Haryanti & Sugama, 1998).

Upaya untuk menyederhanakan dan mengefisienkan penggunaan bakteri probiotik *Alteromonas* sp. BY-9 dalam pemeliharaan larva telah dicoba melalui pakan alami dan buatan agar memudahkan dalam penanganan dan penggunaannya, tanpa mengurangi kemampuan bakteri dalam melakukan perannya. Dengan mengembangkan bakteri *Alteromonas* sp. BY-9 dalam biakan mikroalga, *C. ceratosporum* diharapkan akan lebih efisien dalam penyediaan bakteri probiotik dalam pemeliharaan larva, karena hanya dengan mengkultur mikroalga sekaligus bakteri *Alteromonas* sp. BY-9 sudah ikut berkembang biak pula. Menempelnya bakteri *Alteromonas* sp. BY-9 pada dinding sel mikroalga juga akan menguntungkan bagi larva, karena sel bakteri akan ikut tercerna, sehingga akan meningkatkan pencernaan larva udang. Beberapa ahli juga berpendapat bahwa pertumbuhan mikroalga dapat distimulasi dengan adanya koeksistensi strain bakteri yang diinokulasikan dalam kulturnya (Fukami *et al.*, 1992; Haryanti, 1997; Requelm *et al.*, 1988; Sukoso *et al.*, 1998).

Dalam hubungannya dengan pakan buatan, Fuller (1986) dan Uma (1999) menjelaskan bahwa bakteri probiotik sebagai suplemen pakan memiliki pengaruh menguntungkan untuk memperbaiki keseimbangan mikroflora pada saluran pencernaan larva. Mekanisme aktivitas dari probiotik yaitu (a) menekan pertumbuhan bakteri melalui produksi senyawa antimikrobal, kompetisi nutrisi, dan kompetisi sisi pengikatan, (b) mengubah keseimbangan metabolisme mikrobial

dengan meningkatkan dan menurunkan aktivitas enzim dan, (c) stimulasi immunitas dengan meningkatkan antibodi dan aktivitas *macrophage*. Dengan demikian penambahan bakteri probiotik dalam pakan buatan perlu diuji karena pertimbangan fenomena di atas, sehingga diharapkan dapat diperoleh teknik penggunaan bakteri probiotik yang efektif, baik melalui pakan alami maupun pakan buatan, dan akhirnya dapat berdampak terhadap peningkatan produksi benih udang.

BAHAN DAN METODE

Kultur bakteri *Alteromonas* sp. BY-9

Bakteri *Alteromonas* sp. BY-9 dikembangkan dengan mengikuti metode Nogami & Maeda (1992). Media kultur bakteri probiotik mengandung campuran antara *bacto peptone*, *bacto malt-extract*, *bacto yeast-extract*, dan *bacto soytone* dengan kadar masing-masing 0,05%; 0,1%; 0,05%; dan 0,1% dalam air laut steril dengan pH 7,6 dan suhu 25°C.

Isolat *Alteromonas* sp. BY-9 yang dibiakkan dalam media agar miring disuspensikan dalam 10 mL air laut steril dengan jarum ose. Suspensi bakteri tersebut kemudian diinokulasikan lebih lanjut sebanyak 2,5 mL ke dalam 50 mL media tumbuh baru dan diinkubasikan selama 48 jam dalam 25°C. Bakteri yang telah tumbuh dalam volume ini merupakan inokulan bagi media biakan berikutnya dengan volume yang lebih besar.

Untuk mendapatkan biakan bakteri dengan volume 5 L diperlukan inokulan bakteri sebanyak 10 mL dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 25°C. Selama inkubasi juga ditambahkan aerasi yang telah melalui filter 0,20 mm. Dari volume tersebut biakan *Alteromonas* sp. BY-9 sudah dapat digunakan untuk inokulasi dalam media pemeliharaan larva udang dan inokulasi pada biakan mikroalga *C. ceratosporum*.

Inokulasi bakteri *Alteromonas* sp. BY-9 dalam biakan mikroalga (*C. ceratosporum*)

Mikroalga yang dibiakkan bersama dengan *Alteromonas* sp. BY-9 adalah *C. ceratosporum* dari hasil *axenic clone culture* (biakan sel tunggal yang bebas dari kontaminasi bakteri) sehingga merupakan mikroalga yang bebas bakteri. Untuk membiakkan mikroalga tersebut digunakan pupuk KNO_3 , $\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Fe EDTA, Clewat-32, Na_2SiO_3 , dan *Vitamin mix* dengan konsentrasi masing-masing sebesar 50; 4; 2,5; 5; 50; dan 0,01 mg/L. Media biakan disiapkan dengan sterilisasi basah pada suhu 115°C selama 30 menit dan inokulasinya dilakukan secara aseptik di dalam *clean bench*. Biakan dimulai dari volume 10 mL dalam tabung-tabung reaksi dan diperbesar hingga 100–200 mL.

Bakteri *Alteromonas* sp. BY-9 diinokulasikan ke dalam biakan *C. ceratosporum* pada volume 100-200 mL pada fase *stationer*, sebanyak 10^6 cfu/mL dan kemudian mikroalga ini dikembangkan hingga mencapai volume 30 liter. Pada perkembangbiakan skala laboratoris ini dilakukan pada suhu 23-25°C, penyinaran 4.500 lux dan pemberian aerasi yang telah melalui sistem penyaringan 0,20 mm. Media tumbuh mikroalga pada volume besar tersebut juga ditambahkan media tumbuh bakteri dengan dosis rendah. Biakan mikroalga sudah dapat digunakan dalam pemeliharaan larva setelah mencapai kepadatan sel tertinggi dalam 3-4 hari.

Inokulasi bakteri *Alteromonas* sp. BY-9 dalam pakan buatan mikroenkapsulasi

Untuk mendapatkan bakteri *Alteromonas* sp. BY-9 kering yang akan dicampurkan dalam pakan buatan mikroenkapsulasi, dilakukan dengan membiakkan bakteri tersebut dalam volume 5-10 L hingga mencapai kepadatan 10^{10} - 10^{11} cfu/mL dan disentrifuse pada kecepatan 8.000 rpm, pada suhu 4°C selama 10 menit. Hasil yang diperoleh disimpan terlebih dahulu pada -85°C dengan menambahkan larutan *antifreezing* yang mengandung gliserol 10% dan selanjutnya dikeringkan dengan menggunakan pengeringan dingin (*freeze dryer*). Bobot kering bakteri *Alteromonas* sp. BY-9 yang dicampurkan dalam pakan mikroenkapsulasi diperhitungkan kepadatannya agar menjadi 10^6 cfu/mg pakan. Dalam proses pembuatan pakan buatan tersebut juga dipertimbangkan suhu pemanasan, maksimal sebesar 38°C-40°C, karena bakteri *Alteromonas* sp. BY-9 hanya dapat bertahan hidup pada suhu di bawah suhu tersebut. Metode pembuatan pakan buatan mikroenkapsulasi mengikuti metode Giri *et al.* (1992).

Pemeliharaan larva

Nauplii hasil penetasan telur dari induk matang gonad yang dirangsang dengan ablasi tangkai mata, didesinfeksi dengan 100 mg/L iodine selama 10 menit. Wadah yang digunakan dalam penelitian ini adalah bak polikarbonat volume 1.000 L sebanyak 12 bak. Padat penebaran awal larva (nauplii) adalah 75 ekor/L. Metode pemeliharaan larva sesuai dengan Haryanti *et al.* (1997a). Larva dipelihara hingga stadia pascalarva-10. Selama penelitian larva diberi pakan alami *C. ceratosporum* dengan kepadatan awal 5.000 sel/mL dan secara bertahap ditingkatkan hingga 40.000 sel/mL serta pakan buatan komersial. Pada stadia postlarva diberikan *Artemia salina* dengan kepadatan 5 nauplii artemia per ekor dan terus meningkat hingga mencapai postlarva 10.

Dalam penelitian ini diterapkan 3 perlakuan yaitu: (A) inokulasi bakteri *Alteromonas* sp. BY-9 pada biakan *axenic clone* dari *C. ceratosporum*, (B) inokulasi bakteri *Alteromonas* sp. BY-9 kering (*freeze*

dryer) ke dalam pakan mikroenkapsulasi, dan (C) inokulasi biakan segar bakteri *Alteromonas* sp. BY-9 (kontrol) ke dalam pemeliharaan larva udang. Biakan bakteri yang diinokulasikan dalam media pemeliharaan larva udang sebanyak 10^6 cfu/mL. Masing-masing perlakuan diulang 4 kali. Peubah biologis yang diamati adalah sintasan larva setiap stadia, pertumbuhan, jumlah total bakteri dan vibrio dalam air pemeliharaan larva, dan kualitas air.

Uji vitalitas

Vitalitas benih PL-10 dari masing-masing perlakuan diuji secara fisik yaitu dengan pengeringan di atas kertas saring selama 5 dan 10 menit, sedangkan secara kimiawi dengan perendaman larutan formaldehid (37% kandungan aktif) pada konsentrasi sebesar 100 dan 150 mg/L selama 15 menit. Pengujian dilakukan dengan menggunakan wadah gelas becker volume 1 L yang diisi air laut, dilengkapi dengan aerasi dan padat tebar sebanyak 30 ekor per wadah.

Pada uji pengeringan, benih dikembalikan dalam gelas becker yang berisi air laut setelah waktu uji tercapai dan diamati tingkat kematian atau *stress* masing-masing perlakuan. Hal yang sama juga dilakukan pada perlakuan uji formaldehid.

Pengujian aktivitas enzimatis dari *Extra Celluler Product* (ECP) bakteri *Alteromonas* sp. BY-9

Aktivitas enzimatis *Alteromonas* sp. BY-9 yang telah mendapatkan perlakuan yang berbeda diuji melalui produk ekstra selulernya (ECP) untuk mengetahui kemampuan bakteri sebagai probiotik dan kontrol biologi. Pengujian mengikuti metode Xu Bing *et al.* (1996), yaitu dengan menggunakan teknik *cellophane plate*. Lembaran *cellophane* steril diletakkan pada permukaan *marine agar* (mengandung 1% *bacto peptone*; 0,3% *beef extract*; 0,2% *yeast extract*; 0,01% FePO_4 , dan 1,5% agar; pH 7,5) dalam cawan petri dan diinokulasikan 200 mL biakan *Alteromonas* sp. BY-9 yang telah diperlakukan sesuai dengan masing-masing perlakuan. Lama inkubasi 24 jam pada suhu 25°C. Bakteri yang tumbuh pada permukaan *cellophane* selanjutnya dicuci dengan 4 mL larutan penyangga fosfat (*Phosphate Buffer Solution*/PBS) 0,01M dan pH 7,0. Suspensi bakteri disentrifuge dengan kecepatan 8.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C dan supernatan yang diperoleh disaring secara steril dengan saringan membran 0,20 mm.

Pengujian aktivitas enzimatis dari ECP dilakukan dengan menggunakan teknik *cylinder plate*. Media agar (2% w/v) yang masing-masing mengandung 0,4% gelatin; 0,4% kasein; 0,2% *starch*; 2,5% *egg yolk*;

1,0% Tween 80; 2,0% urea; dan 2,0% phenol red dengan pH 7,5 disiapkan dalam cawan petri, yaitu untuk menguji adanya aktivitas enzim gelatinase, kasease, amilase, lesitinase, lipase, urease, dan kitinase.

Larutan produk extra seluler (ECP) ditambahkan dalam pipa polyethelene berbentuk silinder (*nalgene pipe*) yang diletakkan di atas permukaan media agar dan diinkubasi pada suhu 35°C selama 48 jam. Pengamatan aktivitas *enzym* dilakukan dengan menambahkan 5% HgCl₂ pada agar gelatin, 10% asam trikloroasetat pada agar kasein, lugol iodin pada agar starch serta pengamatan perubahan zone pada media agar.

Pola pita DNA bakteri *Alteromonas* sp. BY-9 melalui amplifikasi PCR dan restriksi panjang fragmen polimorfisme

Alteromonas sp. BY-9 yang ada dalam masing-masing perlakuan (mikroalga, pakan mikroenkapsulasi, dan biakan segar) diisolasi dan dipurifikasi kembali untuk dianalisis keragaannya dengan mengembangbiakkan dan memanen dari 200 mL biakan bakteri melalui sentrifugasi. Konsentrat bakteri dilarutkan dalam 4,75 mL TE buffer (10 mM Tris-Cl dan 1 mM EDTA-2Na, pH 8,0) dan ditambahkan 250 mL *Sodium Dodecyl Sulfat* (SDS) 10% serta 25 ml Proteinase Kinase (20 mg/mL). Suspensi ini diinkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C. Kemudian lysate ditambahkan 5M NaCl sebanyak 900 ml dan 750 mL CTAB-NaCl (10 % CTAB dan 0,7 M NaCl) dan diinkubasi pada 65°C selama 20 menit. Setelah deproteinisasi dengan kloroform dan isoamil alkohol serta hidrolisis enzimatis dengan RNase, genome DNA dilarutkan dalam 300 mL TE *buffer* dan disimpan pada suhu -20°C.

Amplifikasi PCR terhadap genome DNA bakteri *Alteromonas* sp. BY-9 dari masing-masing perlakuan dilakukan dengan mencampurkan beberapa *reagent* (10x PCR *buffer*, 20 mM dNTPs mix; 2 mM MgCl₂; 100 pikomol primer 27 f dan 1492 r; 0,5 Unit taq polimerase dan akuades) dalam mikrotube (200 uL) dan diinkubasi dalam mesin PCR (Takara Biomedicals) dengan 35 *cycles*. Dalam amplifikasi ini digunakan suhu denaturasi 94°C selama 1 menit, suhu annealing 60°C selama 1 menit dan suhu ekstention 72°C selama 3 menit. Untuk mengetahui keragaan fragmen DNA yang telah diamplifikasi, maka digunakan 1,5% agarose gel elektroforesis dalam 1% TAE *buffer* (Tris Asetat EDTA) selama 30 menit. Sebagai molekul maker digunakan DNA ladder 100 bp dan IHIND III, sedangkan untuk staining digunakan ethidium bromide dengan cara perendaman selama 20 menit.

Untuk mengetahui panjang fragmen polimorfismenya, *template* DNA produk amplifikasi PCR dipurifikasi kembali dan dipotong dengan restriksi enzim *Mbo*I, *Hae* III, dan *Hha* I. Dengan menggunakan 4% agarose gel dan elektroforesis selama 30 menit serta pewarnaan dengan etidium bromide, maka akan dapat diperoleh potongan panjang fragmen dari masing-masing *template* DNA. Sebagai molekul maker digunakan DNA ladder 100 bp sedangkan untuk kontrol digunakan *template* DNA yang tidak mengalami pemotongan.

HASIL DAN BAHASAN

Kultur bakteri *Alteromonas* sp. BY-9

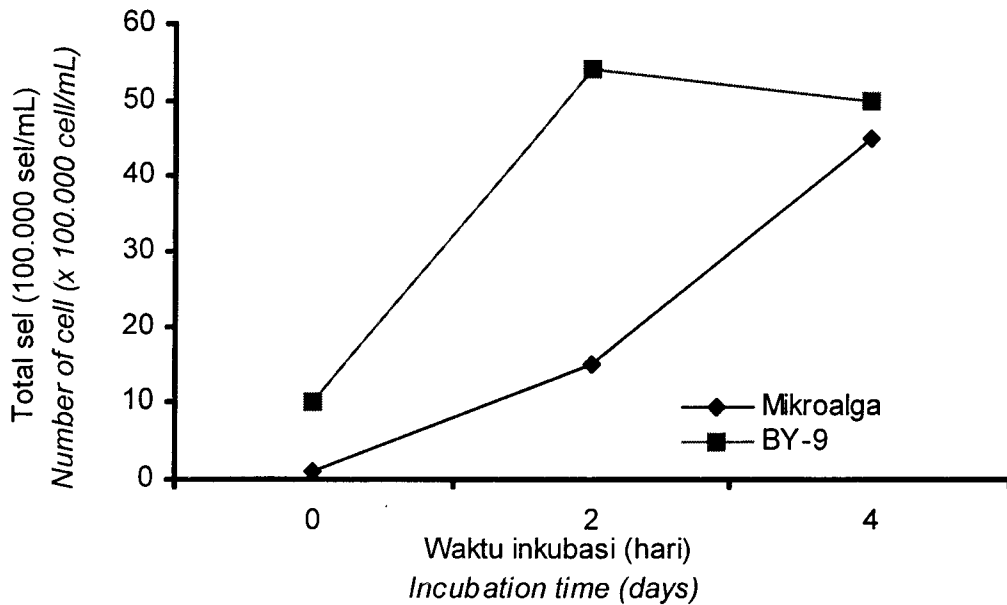
Dari hasil pengembangbiakan bakteri *Alteromonas* sp. BY-9 pada volume besar (5 L) ternyata kepadatan sel tertinggi mencapai 3-5 x 10¹¹ cfu/mL, sedangkan pada volume 50 mL, kepadatan sel yang diperoleh lebih rendah hanya 2 x 10⁹ cfu/mL. Hal ini berhubungan dengan adanya aerasi yang ditambahkan selama pembiakan, sehingga proses perkembangbiakan sel lebih cepat, walaupun sifat dari bakteri BY-9 fakultatif oksidatif, namun oksigen akan memacu dalam pembelahan sel dan metabolisme.

Inokulasi bakteri *Alteromonas* sp. BY-9 dalam biakan mikroalga (*C. ceratosporum*)

Inokulasi *Alteromonas* sp. BY-9 dengan kepadatan 10⁶ cfu/mL dalam biakan mikroalga dari *axenic clone culture* pada volume 100-200 mL dalam fase *stationer* menunjukkan hasil yang positif, baik terhadap pertumbuhan sel mikroalga ataupun sel bakteri hingga dikultur dalam volume 30 L. Hal ini terlihat dari pemantauan pertumbuhan sel bakteri dan mikroalga yang tertera pada Gambar 1. Sel *Alteromonas* sp. BY-9 selain hidup dalam media biakan mikroalga juga menempel pada dinding sel mikroalga, sehingga pembelahan sel mikroalga akan diikuti oleh penempelan bakteri secara terus-menerus.

Inokulasi bakteri *Alteromonas* sp. BY-9 dalam pakan mikroenkapsulasi

Hasil yang diperoleh dari pengeringan beku (*freeze dried*) dari 5 L bakteri *Alteromonas* sp. BY-9 hanya diperoleh 4,3 g bobot kering. Dengan menambahkan 10⁶ cfu per mg pakan maka dapat diperhitungkan kebutuhan pakan dan bakteri kering selama penelitian. Untuk mengkonfirmasi keberadaan *Alteromonas* sp. BY-9, dilakukan pengkulturan kembali pakan mikroenkapsulasi dalam air laut steril dengan pemberian aerasi dan diinkubasi selama 24—48 jam. Ternyata dalam 1 mg pakan hanya diperoleh bakteri *Alteromonas* sp.



Gambar 1. Kepadatan bakteri *Alteromonas* sp. BY-9 dan *C. ceratosporum* dalam wadah pemeliharaan mikroalga
 Figure 1. Density of *Alteromonas* sp. BY-9 and *C. ceratosporum* in the culture tank

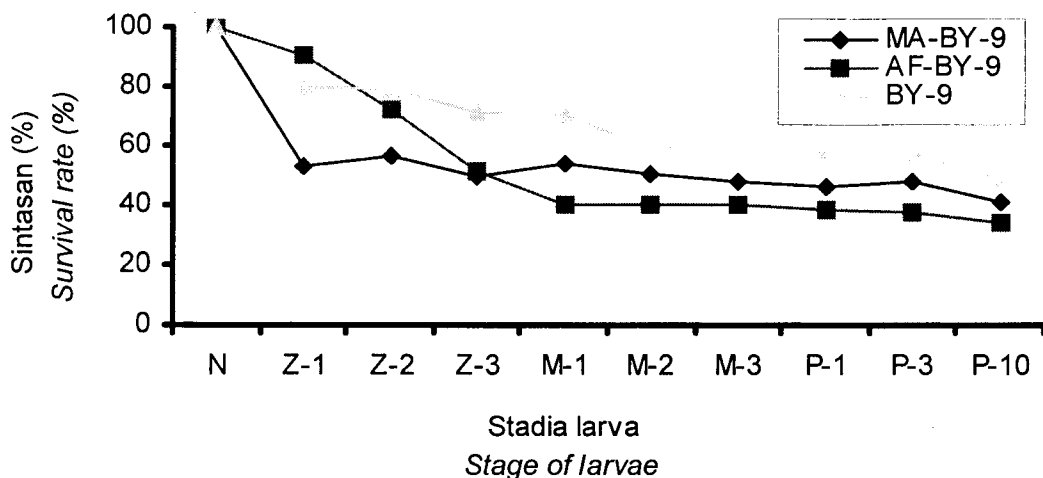
BY-9 sebanyak $5,4 \times 10^3$ cfu/mL pada 24 jam pertama dan meningkat 3×10^4 cfu/mL pada waktu 48 jam. Jumlah ini sangat berkurang bila dibandingkan dengan awal inokulasi dalam pakan (10^6 cfu/mg). Kemungkinan sel bakteri mengalami kematian pada waktu proses pembuatan pakan mikroenkapsulasi yang memerlukan pemanasan untuk pengikatan molekulnya.

Pemeliharaan larva

Hasil yang diperoleh dalam penelitian ini menunjukkan bahwa inokulasi *Alteromonas* sp. BY-9 dalam biakan *C. ceratosporum* dan pakan buatan mikroenkapsulasi memberikan sintasan yang berbeda ($P < 0,05$) bila dibandingkan dengan kontrol. Sintasan

larva yang diinokulasi bakteri *Alteromonas* sp. BY-9 dengan perlakuan yang berbeda terlihat pada Gambar 2. Hal ini menunjukkan bahwa sintasan tertinggi (48,98%) diperoleh pada inokulasi *Alteromonas* sp. BY-9 dalam biakan segar, dan berbeda nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan inokulasi *Alteromonas* sp. BY-9 dalam pakan alami *C. ceratosporum* (40,44%) dan pakan buatan mikroenkapsulasi (33,70%).

Mortalitas larva pada perlakuan inokulasi *Alteromonas* sp. BY-9 dalam pakan alami (mikroalga) dan inokulasi dalam bentuk biakan segar, terjadi secara perlahan-lahan dari sejak stadia zoea hingga pascalarva, sedangkan pada perlakuan inokulasi bakteri pada pakan mikroenkapsulasi, mortalitas



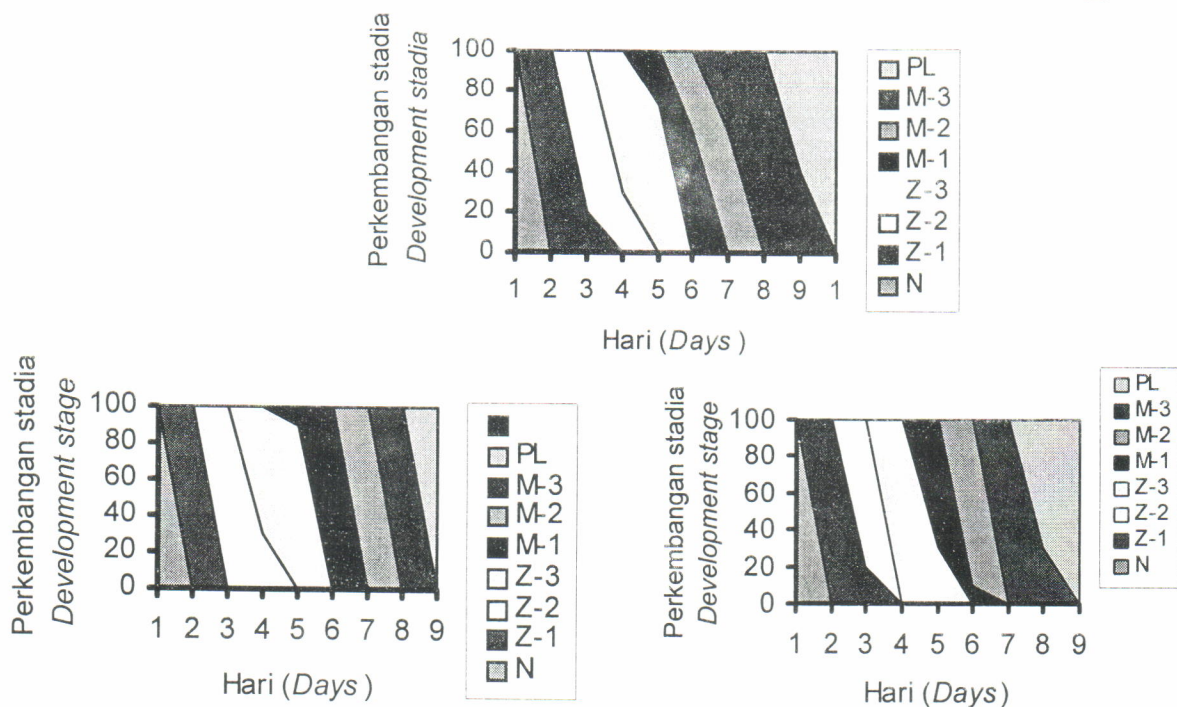
Gambar 2. Sintasan larva *P. monodon* yang diinokulasi *Alteromonas* sp. BY-9 dengan perbedaan perlakuan
 Figure 2. Survival rate of *P. monodon* larvae reared with different treatment inoculation of *Alteromonas* sp. BY-9

secara cepat terjadi sejak stadia zoea-3 hingga mysis dan berlanjut hingga pascalarva.

Hasil dari pengamatan pertumbuhan larva udang, terlihat bahwa larva yang dipelihara dengan menginokulasi bakteri *Alteromonas* sp. BY-9 dalam mikroalga dan biakan segar ternyata tidak berbeda nyata, yaitu diperlukan 9 hari hingga mencapai stadia pasca larva-1, sedangkan inokulasi *Alteromonas* sp. BY-9 dalam pakan mikroenkapsulasi terlambat 24--36 jam yang dimulai sejak perubahan stadia zoea-3 menjadi mysis-1 dan berlanjut hingga pascalarva-1, seperti tersaji pada Gambar 3. Pengamatan kualitas air pemeliharaan larva menunjukkan hasil yang berada pada kisaran yang masih dapat ditoleransi dan layak untuk sintasan larva. Kisaran nilai suhu antara 27,0°C--27,5°C (pagi) dan 28,5°C--28,9°C (sore); nilai pH antara 8,10--8,25 (pagi) dan 8,20--8,31 (sore); dan salinitas 34--35 ppt.

Hasil dari pengamatan populasi total bakteri, vibrio, dan keberadaan bakteri *Alteromonas* sp. BY-9 dalam

(inokulasi bakteri *Alteromonas* sp. BY-9 dalam pakan alami) dan perlakuan B (inokulasi *Alteromonas* sp. BY-9 dalam pakan buatan mikroenkapsulasi) relatif lebih tinggi 4×10^2 dan $4-8 \times 10^2$ cfu/mL bila dibandingkan dengan kontrol (inokulasi *Alteromonas* sp. BY-9 dalam bentuk sel segar), 2×10^2 cfu/mL. Bila dilihat dari keberadaan sel bakteri *Alteromonas* sp. BY-9 dalam media pemeliharaan larva, terlihat bahwa sel bakteri *Alteromonas* sp. BY-9 dalam perlakuan C lebih tinggi populasinya ($6-8 \times 10^3$ cfu/mL) bila dibandingkan dengan perlakuan A (4×10^3 cfu/mL) dan B (2×10^3 cfu/mL). Hal ini menunjukkan adanya korelasi positif antara jumlah sel bakteri *Alteromonas* sp. BY-9 yang cukup kepadatannya dalam media pemeliharaan larva akan melakukan fungsinya sebagai kontrol biologi yaitu menekan pertumbuhan vibrio atau bakteri oportunistik patogen lainnya serta peran probiotik. Hasil yang diperoleh Moriarty 1998, juga menunjukkan bahwa dengan penambahan *Bacillus* antara 1×10^4 hingga 1×10^5 cfu/



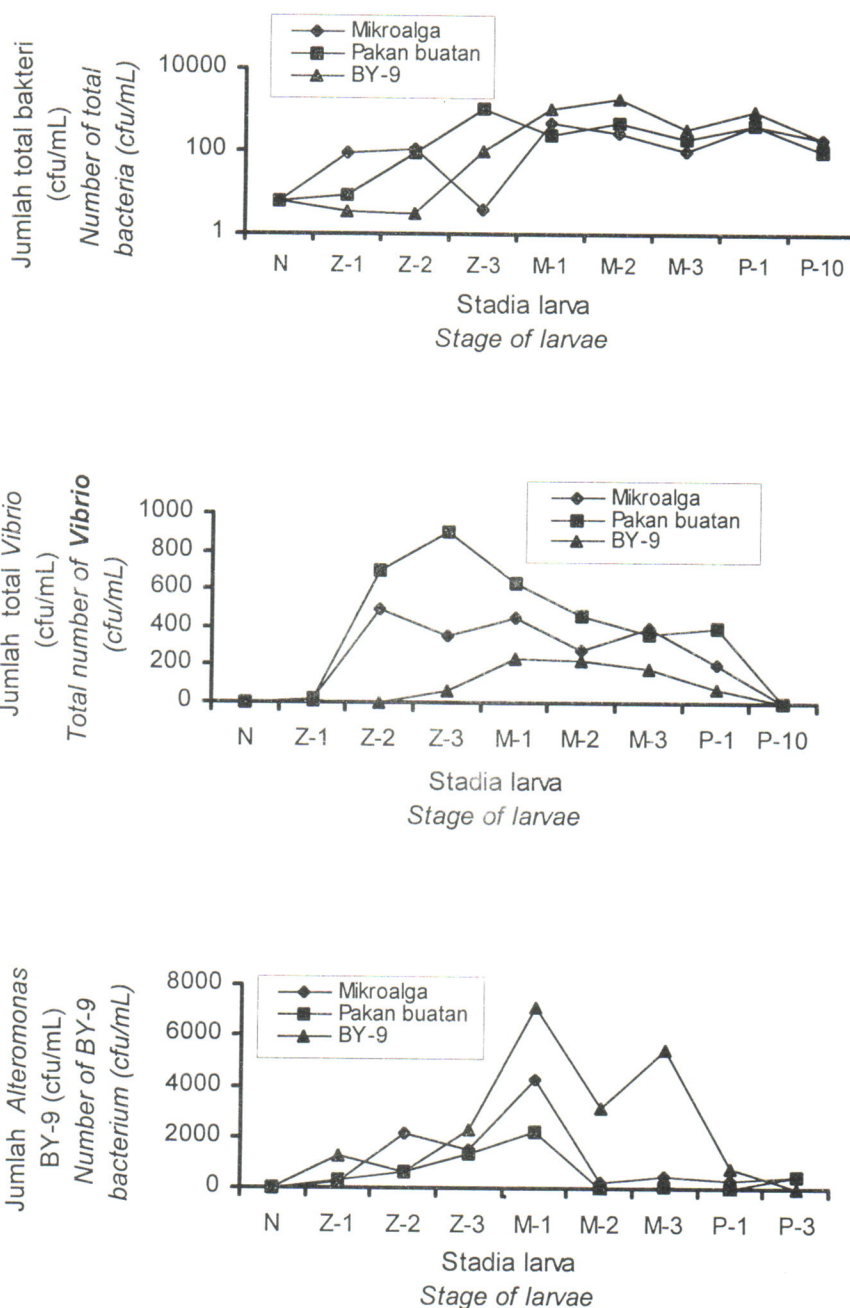
Gambar 3. Perkembangan stadia larva *P. monodon* yang diinokulasikan bakteri *Alteromonas* sp. BY-9 dengan perlakuan yang berbeda (A: *Alteromonas* sp. BY-9 dalam mikroalga; B: *Alteromonas* sp. BY-9 dalam pakan buatan; C: *Alteromonas* sp. BY-9 segar)

Figure 3. Development stage of shrimp larvae of *P. monodon* with different treatment inoculation of *Alteromonas* sp. BY-9 (A: *Alteromonas* sp. BY-9 in microalgae; B: *Alteromonas* sp. BY-9 in artificial feed; C: *Alteromonas* sp. BY-9 fresh form)

media pemeliharaan larva yang mendapat perlakuan berbeda tertera pada Gambar 4. Nampaknya total bakteri dalam media pemeliharaan larva antar perlakuan tidak berbeda kepadatannya, yaitu berkisar 10^2 -- 10^4 cfu/mL. Namun populasi *vibrio* menunjukkan perbedaan antar perlakuan, yaitu pada perlakuan A

mL dapat menekan populasi luminous *Vibrio* dan meningkatkan produksi udang serta mempertahankan kolom air yang lebih baik.

Adanya perbedaan sintasan dan pertumbuhan larva dari ketiga perlakuan tersebut dimungkinkan karena



Gambar 4. Pola pertumbuhan total bakteri, *Vibrio*, dan *Alteromonas* sp. BY-9 dalam wadah pemeliharaan larva yang diinokulasi bakteri *Alteromonas* sp. BY-9 dengan perlakuan berbeda
 Figure 4. Growth pattern of total bacteria, *Vibrio*, and *Alteromonas* sp. BY-9 in the rearing tank with different treatment inoculation of *Alteromonas* sp. BY-9

bakteri *Alteromonas* sp. BY-9 yang ditambahkan memerankan kemampuannya dalam penekanan populasi *Vibrio* patogen maupun bakteri oportunistik patogen, yaitu dengan mengeluarkan senyawa semacam antibakterial, sehingga selama pemeliharaan jumlah *Vibrio* sangat rendah populasinya. Efek antibakterial dari bakteri pada umumnya disebabkan oleh kombinasi beberapa faktor yaitu produksi antibiotik,

bacteriocins, siderospore, lysozyme, protease, dan pelepasan nilai pH yang menghasilkan asam organik (Sugita *et al.*, 1998). Pendapat yang dikemukakan oleh Nakamura *et al.* (1999) menunjukkan bahwa mekanisme bakteri dapat berperan sebagai agen biokontrol dalam menekan *Vibrio* adalah dihasilkannya senyawa vibriostatik atau vibriosidal oleh bakteri dan *niche competition* antara *Vibrio* patogen dan bakteri agen biokontrol.

Menurut Gibson *et al.* (1998), bakteri probiotik *Aeromonas media* dapat melepaskan senyawa penghambat yang disebut *Bacteriocin-like inhibitory substance* pada Pasifik oyster *Crassostrea gigas*. Hal yang sama juga ditunjukkan oleh Douillet & Langdon (1994) bahwa penambahan bakteri CA2 sebagai suplemen pakan pada biakan axenic larva *Crassostrea gigas* dengan kepadatan 10^5 cfu/mL dapat meningkatkan pertumbuhan larva oyster. Kondisi ini disinyalir bahwa bakteri mempunyai kontribusi nutrisi terhadap pertumbuhan larva.

Di samping itu diduga bahwa dengan jumlah sel yang cukup dalam media pemeliharaan larva, bakteri *Alteromonas* sp. BY-9 juga memperbaiki fungsi pencernaan larva udang, sehingga keragaan pertumbuhan larva relatif lebih cepat. Sementara pada perlakuan inokulasi *Alteromonas* sp. BY-9 dalam pakan buatan mikroenkapsulasi, jumlah sel relatif rendah yang kemungkinan disebabkan oleh proses pembuatan pakan melalui pemanasan, maka kemampuan memerankan perannya sebagai pengontrol biologis maupun probiotik menjadi menurun. Akibat lebih lanjut, keragaan sintasan dan pertumbuhan larva udang juga lebih rendah. Hasil penelitian Rengpipat *et al.* (1998) menunjukkan bahwa penambahan bakteri probiotik dalam pakan tidak memberikan perbedaan pertumbuhan bila dibandingkan dengan kontrol (tanpa probiotik), tetapi sintasan maupun penampakan eksternal sangat berbeda, yaitu udang lebih sehat setelah diuji tantang dengan *Vibrio harveyi* dengan 100% sintasan dan tanpa perubahan tekstur hepatopankreas dan saluran pencernaan.

Vitalitas benih pada PL-10

Dari hasil uji vitalitas yang diperoleh ternyata benih yang dipelihara dengan inokulasi bakteri *Alteromonas* sp. BY-9 dalam pakan alami ataupun dalam pakan buatan mikroenkapsulasi dan bentuk sel segar tidak berbeda nyata dalam menerima respon pengeringan selama 5 menit di atas kertas saring, yaitu dengan tingkat *stress* 7%--13% dan sintasan masing-masing 87%, 80%, dan 93%. Namun, pada uji pengeringan 10 menit nampaknya benih tidak dapat merespon perlakuan tersebut, sehingga sintasan antara 3 perlakuan relatif rendah (50%--73%), sedangkan tingkat *stress* juga tinggi. Dalam uji ini nampaknya perlakuan inokulasi *Alteromonas* sp. BY-9 dalam pakan mikroenkapsulasi dan sel segar memberikan sintasan lebih tinggi, masing-masing 73% dan 70%.

Hasil uji perendaman formalin (kandungan formaldehid 37% p.a.) ternyata dengan konsentrasi 100 mg/L selama 15 menit, benih dapat merespon dengan baik dan sintasan yang diperoleh tidak berbeda nyata

($P > 0,05$) antar 3 perlakuan, yaitu 87%--93% dan tingkat *stress* yang rendah. Sedangkan pada perendaman dengan konsentrasi 150 mg/L larva banyak mengalami *stress* dan diasumsikan akan mengalami kematian, sehingga sintasan relatif rendah hanya berkisar antara 67%--73%.

Perbedaan kemampuan benih dalam merespon uji vitalitas yang diberikan mungkin berhubungan dengan perlakuan yang diterapkan selama pemeliharaan larva. Nampaknya perlakuan inokulasi bakteri *Alteromonas* sp. BY-9 dalam pakan buatan mikroenkapsulasi atau bentuk segar relatif memberikan kontribusi nutrisi dalam saluran pencernaannya. Walaupun masih merupakan tanda tanya hubungan efek *probiotik* pada respon imunitas pada larva udang, namun kemungkinan ke arah tersebut masih ada peluang.

Aktivitas enzimatik dari produk ekstra seluler (ECP) bakteri *Alteromonas* sp. BY-9

Hasil pengujian terhadap aktivitas enzimatik dari produk ekstra seluler bakteri *Alteromonas* sp. BY-9 yang telah mendapatkan perlakuan yang berbeda, ternyata ada beberapa koloni pada perlakuan A (inokulasi BY-9 pada pakan alami) dan B (inokulasi BY-9 pada pakan mikroenkapsulasi) menunjukkan aktivitas enzimatik yang berbeda bila dibandingkan dengan kontrol, yaitu pada aktivitas lipase, urease, dan kitinase. Hal ini mungkin disebabkan oleh sedikitnya enzim yang terekstraksi, sehingga tidak ada sintesis dalam agar, dan selanjutnya tidak terbentuk gambaran *zone* di sekitar pipa silinder pada agar. Sementara itu pada aktivitas enzimatik urease dan kitinase yang positif diduga adanya kontaminasi bakteri lain selama inkubasi, sehingga terbentuk gambaran *zone* tipis di sekitar pipa silinder *nalgene* pada agar.

Namun demikian perbedaan tersebut dapat dikonfirmasi kembali secara molekuler dengan pengujian DNA melalui amplifikasi PCR dan pemotongan *template* DNA-nya dengan beberapa enzim restriksi untuk mengetahui panjang fragmen polimorfismenya. Dari hasil yang diperoleh akan dapat diambil gambaran tentang kebenaran sifat bakteri *Alteromonas* sp. BY-9 walaupun sudah mendapat perlakuan tertentu.

Keragaan genome DNA dengan amplifikasi PCR dan restriksi panjang fragmen polimorfisme

Dari hasil PCR amplifikasi genome DNA *Alteromonas* sp. BY-9 yang telah mendapatkan perlakuan berbeda tertera pada Gambar 5. Dari hasil tersebut nampak bahwa bakteri *Alteromonas* sp. BY-9 yang diisolasi dan dipurifikasi dari masing-masing perlakuan, dapat diamplifikasi dengan 16S r DNA dan

Tabel 1. Uji vitalitas benih udang yang dipelihara dengan inokulasi bakteri *Alteromonas* sp. BY-9 dengan perlakuan yang berbeda
 Table 1. *Vitality test of shrimp fry reared with inoculation of Alteromonas sp. BY-9 in different treatments*

Perlakuan <i>Treatment</i>	<i>Alteromonas</i> BY-9 dalam mikroalga <i>Alteromonas BY-9 in microalgae (A)</i>			<i>Alteromonas</i> BY-9 dalam pakan buatan <i>Alteromonas BY-9 in the artificial feed</i>			Sel segar <i>Alteromonas</i> BY-9 <i>Whole cell of Alteromonas BY-9</i>		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Pengeringan pada kertas saring selama (<i>Dried on filter paper</i>)									
5 menit (<i>minute</i>) :									
Stres (<i>stress</i>) (%)	13			20			7		
Mati (<i>lethal</i>) (%)	-			-			-		
Hidup (<i>survive</i>) (%)	87			80			93		
10 menit (<i>minute</i>) :									
Stres (<i>stress</i>) (%)	17			10			13		
Mati (<i>lethal</i>) (%)	33			17			17		
Hidup (<i>survive</i>) (%)	50			73			70		
Perendaman dalam formaldehide (<i>Deep in formaldehide</i>)									
100 mg/L:									
Stres (<i>stress</i>) (%)	13			7			7		
Mati (<i>lethal</i>) (%)	-			-			-		
Hidup (<i>survive</i>) (%)	87			93			93		
150 mg/L:									
Stres (<i>stress</i>) (%)	33			27			30		
Mati (<i>lethal</i>) (%)	-			-			-		
Hidup (<i>survive</i>) (%)	67			73			70		

memberikan fragmen tunggal. Suhu anealing 60°C dapat memberikan hasil yang baik dalam membentuk ikatan antara *template* DNA dengan primer 27 f dan 1492 r. Dari ketiga perlakuan ternyata tidak ada perubahan berat molekul dari masing-masing isolat strain *Alteromonas* sp. BY-9 yaitu antara 1.500 bp.

Template DNA yang dihasilkan dari purifikasi produk amplifikasi PCR dan setelah dilakukan pemotongan dengan 3 restriksi enzim, *Mbo* I, *Hae* III, dan *Hha* I terlihat pada Gambar 6. Terlihat bahwa *Mbo* I, *Hae* III, dan *Hha* I dapat memotong fragmen DNA bakteri *Alteromonas* sp. BY-9 secara sempurna

Tabel 2. Aktivitas enzimatik dari produk ekstra seluler *Alteromonas* sp. BY-9 yang mendapat perlakuan yang berbeda
 Table 2. *Enzymatic activity of extracellular product of Alteromonas sp. BY-9 after treated with different methods*

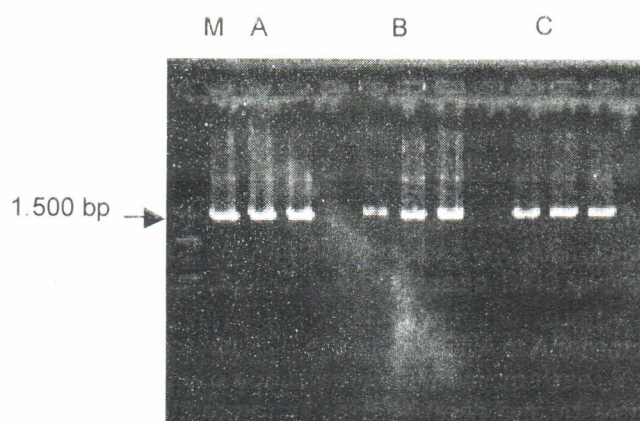
Peubah <i>Parameters</i>	<i>Alteromonas</i> BY-9 dalam mikroalga <i>Alteromonas BY-9 in microalgae (A)</i>			<i>Alteromonas</i> BY-9 dalam mikroalga <i>Alteromonas BY-9 in microalgae (A)</i>			<i>Alteromonas</i> BY-9 dalam mikroalga <i>Alteromonas BY-9 in microalgae (A)</i>		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	Gelatinase	+	+	+	+	+	+	+	+
Casease	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amilase	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lesithinase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lipase	-	+	+	+	-	-	+	+	+
Urease	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Chitinase	+	-	-	-	-	-	-	-	-

menjadi 3 fragmen pada *Mbo* I dan 4 fragmen pada *Hae* III dan *Hha* I, sedangkan pada kontrol tidak terjadi pemotongan fragmen.

Hal ini menunjukkan bahwa *Alteromonas* sp. BY-9 walaupun telah mendapat perlakuan berbeda, yaitu diinokulasikan dan menempel pada mikroalga ataupun diinokulasikan dalam pakan mikroenkapsulasi, ternyata tidak mengalami perubahan keragaan dan berat molekul DNA. Dengan demikian, peran dan kemampuan *Alteromonas* sp. BY-9 sebagai biologikal kontrol dan probiotik dalam pemeliharaan larva tidak mengalami penurunan walaupun telah mendapatkan perlakuan yang berbeda.

memberikan sintasan 40,44%; 33,70%; dan 48,98%.

- * Laju pertumbuhan larva dengan inokulasi *Alteromonas* sp. BY-9 dalam pakan mikroenkapsulasi lebih lambat 1 hari bila dibandingkan dengan 2 perlakuan lainnya, dan vitalitas larva yang tidak berbeda nyata antar perlakuan.
- * Aktivitas enzimatik dari produk ekstra seluler dan keragaan DNA bakteri *Alteromonas* sp. BY-9 tidak mengalami perubahan walaupun telah mengalami perlakuan yang berbeda, dengan demikian peran dan kemampuannya sebagai kontrol biologi maupun probiotik dalam pemeliharaan larva udang tidak berubah pula.



Gambar 5. Pola pita-pita tunggal genome DNA bakteri *Alteromonas* sp. BY-9 yang mendapat perlakuan berbeda setelah melalui amplifikasi PCR (A. *Alteromonas* sp. BY-9 dalam mikroalga, B. *Alteromonas* sp. BY-9 dalam pakan mikroenkapsulasi, C. *Alteromonas* sp. BY-9 sel segar, M. Marker 100 bp DNA ladder)

Figure 5. Pattern of single band amplification PCR of genomic DNA of *Alteromonas* sp. BY-9 after treated with different methods (A. *Alteromonas* sp. BY-9 in microalgae, B. *Alteromonas* sp. BY-9 in microencapsulated diet, C. *Alteromonas* sp. BY-9 fresh form, M. Marker 100 bp DNA ladder)

Berdasarkan pada hasil tersebut, konsep penggunaan *Alteromonas* sp. BY-9 dalam pemeliharaan larva baik dalam bentuk segar maupun diinokulasikan dalam pakan alami atau pakan buatan (mikroenkapsulasi), nampaknya memberikan harapan dalam akuakultur dan merupakan alternatif dalam budi daya udang berkelanjutan secara industrial dan berwawasan lingkungan tanpa penggunaan antibiotik. Selain itu penggunaan yang sederhana dan mudah dari *Alteromonas* sp. BY-9 ini akan sangat diharapkan dari praktisi hatcheri.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

- * Aplikasi bakteri *Alteromonas* sp. BY-9 melalui inokulasi dalam pakan alami, pakan buatan mikroenkapsulasi maupun sel segar masing-masing

Saran

Disarankan agar dilakukan penerapan metode dan proses pembuatan pakan mikroenkapsulasi dengan menggunakan suhu yang dapat ditoleransi oleh bakteri *Alteromonas* sp. BY-9, agar tidak terjadi mortalitas setelah diaplikasikan dalam media pemeliharaan larva.

UCAPAN TERIMA KASIH

Dengan selesainya penelitian ini kami mengucapkan terima kasih atas bantuan dan kerja sama yang baik dari para teknisi di Laboratorium Bioteknologi dan Hatcheri Udang. Terima kasih pula diucapkan pada project JICA (Japan International Cooperation Agency) ATA 379, AIMS (Australian Institute of Marine Science) dan CSIRO (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization) yang telah membantu dalam penyediaan peralatan. Penelitian ini dilaksanakan atas biaya dari APBN Indonesia tahun anggaran 1999-2000.



Gambar 6. Pemotongan *template* DNA dari bakteri *Alteromonas* sp. BY-9 setelah mendapat perlakuan yang berbeda dengan enzim restriksi *Mbo* I (A), *Hae* III (B), dan *Hha* I (C) (1-2: *Alteromonas* sp. BY-9 dalam mikroalga, 3-4: *Alteromonas* sp. BY-9 dalam pakan mikroenkapsulasi, 5-6: *Alteromonas* sp. BY-9 segar, 7: *Alteromonas* sp. BY-9 yang tidak dipotong, M: Marker 100 bp DNA ladder)

Figure 6. Digestion of DNA *template* of *Alteromonas* sp. BY-9 after treated with different restriction enzyme *Mbo* I (A), *Hae* III (B), and *Hha* I (C) (1-2: *Alteromonas* sp. BY-9 in microalgae, 3-4: *Alteromonas* sp. BY-9 in microencapsulated diet, 5-6: *Alteromonas* sp. BY-9 fresh form, 7: Undigestion of *Alteromonas* sp. BY-9, M: Marker 100 bp DNA ladder)

DAFTAR PUSTAKA

- Ditjenkan. 1999. *Program Pengembangan Budidaya Udang Nasional 250.000 ha dalam Rangka Pencapaian Devisa Produksi Perikanan US\$ 8 Milyard*. Direktorat Jendral Perikanan (in press).
- Douillet, P.A and C.J. Langdon. 1994. Use of a probiotic for culture of larvae of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture* 119: 25--40.
- Fukami, K., A. Yuzawa, T. Nishijima, and Y. Hata. 1992. Isolation and properties of bacterium inhibiting the growth of *Gymnodinium nagasakiense*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58(6): 1073--1.077.
- Fuller, R. 1986. Probiotics, *J. Appl. Bacteriol. Suppl.* 5--75.
- Gibson, L.F., J. Woodworth, and A.M. George. 1998. Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pasific oyster *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashi*. *Aquaculture* 169:111--120.
- Giri, N.A., M. Marzuqi, Jufri, dan C. Kuma. 1992. Studi pendahuluan pengaruh beberapa sumber protein terhadap perkembangan dan kelangsungan hidup larva udang windu *Penaeus monodon*. *J. Penel. Budidaya Pantai* 8(3): 57--66.
- Haryanti. 1997. Preliminary studi on the use of bacteria as biocontrol for culture of microalgae *Chaetoceros ceratosporum*. In Darussamin A., I.P. Kompiang, S. Moeljopawiro (Eds.). Current status of agricultural biotechnology in Indonesia. *Proceedings second Conference on Agricultural Biotechnology*, Jakarta, 13--15 June 1995. p. 563--569.
- Haryanti, S. Lante, and S. Tsumura. 1997a. Studi pendahuluan penggunaan bakteri BY-9 sebagai probiotik dalam pemeliharaan larva udang windu *Penaeus monodon*. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia* 1(1): 44--52.
- Haryanti, K. Sugama, S. Lante, and S. Tsumura. 1997b. Teknik biokontrol dalam pembenihan udang *Penaeus monodon*. *Prosiding Regional Hasil-hasil Penelitian Berbasis Perikanan, Peternakan, Sistem Usaha Tani di Kawasan Timur Indonesia*, Kupang 28--30 Juli 1997.
- Haryanti and K. Sugama. 1998. Diseases problem and use of bacteria as biocontrol agent for larval rearing of *Penaeus monodon* in Indonesia. In Huai-Shu Xu (eds.). *Proceeding of the Regional Workshop on Disease Problems of Shrimp Culture Industry in the Asian Region and Technology of Shrimp Disease Control*. October 9-14, 1998 Qingdao, China. p. 1--9.
- Haryanti, K. Sugama, and S. Tsumura. 1998. Use of BY-9 as a probiotic agent in the larval rearing of *Penaeus monodon*. In T.W. Flegel (Eds.). *Advances in shrimp biotechnology. Proceedings to the Special Session on Shrimp Biotechnology*, 5th Asian Fisheries Forum, 11-14 November 1998, Chiangmai, Thailand. p. 183--185.
- Moriarty, D.J.W. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture* 164: 351--358.
- Nakamura, A., K.G. Takahashi, and K. Mori. 1999. Vibriostatic bacteria isolated from rearing seawater of oyster broodstock: Potenciality as biocontrol agents for vibriosis in oyster larvae. *Fish Pathology* 34(3): 139--144.
- Nogami, K. and M. Maeda. 1992. Bacteria as biocontrol agent for rearing larva of the crab, *Portunus trituberculatus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 49(11): 2373--2376.
- Rengpipat, S., W. Phianphak, S. Piyatiratitivorakul, and P. Menasveta. 1998. Effects of a probiotic bacterium

- on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture* 167: 310--313.
- Riquelm, C.E., K. Fukami, and Y. Ishida. 1988. Effect of bacteria on the growth of marine diatom, *Asterionella glacialis*. *Bull. Japan. Soc. Microbiol. Ecol.* 3: 29--34.
- Sugita, H., Y. Hirose, N. Matsuo, and Y. Deguchi. 1998. Production of the antibacterial substance by *Bacillus* sp. strain NM 12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. *Aquaculture* 165: 269--280.
- Sukoso, K. Iwamoto, T. Sakata, and T. Yoshikawa. 1998. Characteristic of filamentous bacteria co-existing with some marine microalgae. *Fisheries Science* 64(1): 65--70.
- Uma, A. 1999. *Feed Probiotics for Sustainable Aquaculture*. Asian Aquaculture, Aquaculture Department, SEAFDEC, Philippines XXI(2): 13--15.
- Xu Bing, J. Weishang, and X. Huai Shu. 1996. Pathogens and pathogenicity to *Penaeus orientalis* Kishinouye. *Selected Paper on Marine Biotechnology*. College of Marine Life Science, Ocean University of Qingdao. p. 229--239.