

## KARAKTERISASI DAN IDENTIFIKASI MOLEKULER ISOLAT BT951 SERTA EVALUASI POTENSINYA SEBAGAI BAKTERI PROBIOTIK PADA BUDIDAYA UDANG WINDU (*Penaeus monodon*)

Muliani, Nurbaya, dan Endang Susianingsih

Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau  
Jl. Makmur Dg. Sitakka No. 129, Maros 90512, Sulawesi Selatan  
E-mail: *mulianim@yahoo.com*

(Naskah diterima: 25 Juli 2011; Disetujui publikasi: 29 September 2011)

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik, dan menentukan posisi relatif isolat BT951 melalui identifikasi molekuler menggunakan gen 16S-rRNA, serta mengevaluasi potensinya sebagai probiotik pada budidaya udang windu (*P. Monodon*). Penelitian ini meliputi tahapan: (1) isolasi dan karakterisasi secara morfologi; (2) uji fisiologi dan biokimia; (3) identifikasi isolat BT951 secara molekuler; (4) uji sensitifitas terhadap antibiotik; (5) uji daya hambat isolat BT951 terhadap *V. harveyi*; (6) uji patogenisitas isolat BT951 terhadap larva udang; (7) uji tantangan isolat BT951 dengan *V. harveyi*; (8) uji ketahanan isolat BT951 pada suhu ruang dan suhu 4°C. Hasil penelitian menunjukkan bahwa, secara morfologi isolat BT951 koloninya berbentuk bulat kecil, berwarna krem kekuningan, tepian licin, dan cembung, termasuk kelompok bakteri gram positif yang berbentuk batang, oksidase dan katalase positif, indol negatif, dan bersifat motil. Bakteri ini dapat tumbuh pada suhu 40°C, salinitas 0-50 ppt, dan sensitif terhadap beberapa jenis antibiotik seperti rifampisin, eritromisin, dan klorampenikol akan tetapi resisten terhadap ampicilin, oksitetrasiklin, gentamisin, dan furazolidon. Berdasarkan hasil analisis gen 16S-rRNA menunjukkan bahwa isolat BT951 termasuk kelompok *Brevibacillus laterosporus* dengan indeks kedekatan sebesar 97,7%. Bakteri ini tidak bersifat patogen terhadap udang windu, dapat menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi*, dan potensial dijadikan sebagai bakteri probiotik pada budidaya udang windu.

**KATA KUNCI:** isolat BT951, probiotik, *Brevibacillus laterosporus*, *Penaeus monodon*

**ABSTRACT:** *Characterization and molecular identification of BT951 and evaluation of its potential as probiotic bacteria in tiger shrimp (Penaeus monodon) culture. By: Muliani, Nurbaya, and Endang Susianingsih*

*The aims of this experiment were to characterize and analyze the relative position of BT951 isolate through molecular biology identification using 16S-rRNA gen, and evaluate its potential as a probiotic bacteria in tiger shrimp (P. monodon) culture. The experiment consisted of several steps i.e; (1) isolation and morphological characterization; (2) biochemical and physiological characterization; (3) molecular identification of BT951; (4) antibiotic sensitivity test; (5) inhibition test of BT951 bacteria to V. harveyi; (6) pathogenecity test of BT951 isolate to tiger shrimp larvae;*

(7) *in vitro* and *in vivo* challenge test of BT951 bacteria against *V. harveyi*; (8) survival test of BT951 at room and 4°C temperatures. Morphological characterization showed that the colonies of BT951 were small, circular, yellowish-white, has smooth edges, and convex shape. Physiological and biochemical test showed that BT951 isolate was gram positive, short-rod shape, catalase and cytochrome oxidase positive, indole negative, non motile, proteolytic, Lysine and arginin Decarboxilase positive. This bacteria can still grow at 40°C, salinity of 0-50 ppt, and sensitive to rifampicine, erythromicine, and chloramphenicol, but resistant to ampicilin, oxytetracycline, gentamicine, dan furazolidone. Base on 16S-rRNA sequencing, BT951 isolate was closely related (97.7%) to DNA sequence of *Brevibacillus laterosporus*. This bacteria is not pathogenic to tiger shrimp larvae, known to have inhibitory effect on the growth of *V. harveyi*, and potential as probiotic bacteria in tiger shrimp culture.

**KEYWORDS:** *isolat BT951, Probiotik, Brevibacillus laterosporus, Penaeus monodon*

## PENDAHULUAN

Keberhasilan budidaya udang di tambak masih terkendala oleh serangan penyakit yang masih saja terus terjadi meskipun telah dilakukan berbagai upaya pencegahan dan penanggulangan. Serangan penyakit tersebut tidak hanya terjadi pada *level* budidaya akan tetapi juga pada *level* perbenihan. Di tambak, serangan penyakit umumnya disebabkan oleh serangan virus. Ada beberapa jenis virus yang sering teridentifikasi menginfeksi udang di tambak di antaranya, MBV, IHNV, HPV, dan WSSV. Namun di antara jenis-jenis virus tersebut, WSSV merupakan penyebab utama terjadinya kematian udang di tambak yang berefek terhadap merosotnya industri pertambakan udang (Leonardo *et al.*, 2005; Balasubramanian *et al.*, 2008). Jenis virus ini tidak hanya menyerang udang windu tetapi juga udang vaname yang saat ini telah dibudidayakan secara meluas di hampir seluruh pertambakan di Indonnesia. Serangan penyakit di *level* perbenihan masih saja disebabkan oleh serangan bakteri berpendar yaitu *V. harveyi*. Meskipun sering ditemukan adanya larva udang yang positif terinfeksi oleh WSSV, akan tetapi kematian massal benur di perbenihan akibat serangan virus ini masih jarang, bahkan hampir tidak pernah ada laporan akan hal tersebut.

Berbagai upaya pencegahan dan penanggulangan penyakit pada budidaya udang windu telah dilakukan, namun hasilnya belum memberikan hasil yang maksimal sehingga serangan penyakit masih terus terjadi. Serangkaian penelitian maupun uji coba telah dilakukan untuk mendapatkan metode pencegahan dan penanggulangan

penyakit pada udang windu antara lain dengan menggunakan obat-obatan dan antibiotik sebagai anti bakteri (Karunasagar *et al.*, 1994). Pengelolaan limbah budidaya udang dengan menggunakan tandon dan biofilter juga telah banyak dilakukan (Chanratchakool *et al.*, 1995; Muliiani *et al.*, 1998a). Upaya lain yang telah dilakukan untuk pencegahan penyakit pada budidaya udang windu adalah dengan merangsang kekebalan non-spesifik melalui penggunaan vaksin dan imunostimulan (Itami & Takashi, 1991; Sung *et al.*, 1994; Devaraja *et al.*, 1998; Salfira, 1998; Vargas-Albores *et al.*, 1998), penggunaan ekstrak mikroalga untuk merangsang kekebalan dan resistensi terhadap penyakit (Supamattaya *et al.*, 2005), penggunaan probiotik (Austin & Day, 1990; Lavilla-Pitogo *et al.*, 1998; Rengpipat *et al.*, 1998; Maeda, 1999), serta penggunaan bahan aktif sponge dan hydrozoan sebagai anti-bakteri (Ahmad *et al.*, 1995; Muliiani *et al.*, 1998b; Suryati *et al.*, 2000). Namun demikian usaha tersebut belum membuahkan hasil yang maksimal dan serangan penyakit masih saja terus terjadi.

Seleksi dan upaya pemanfaatan beberapa jenis bakteri yang diisolasi dari berbagai sumber sebagai, biokontrol, probiotik, dan penghasil antivibriosis telah banyak dilakukan (Devaraja *et al.*, 2002). Oclarit *et al.* (1994) telah mengisolasi bakteri penghasil antibakterial, *o-Aminiphenol* dari sponge, *Adocia* sp. Populasi *V. harveyi* di lingkungan pemeliharaan udang dapat ditekan dengan cara mengintroduksi bakteri tertentu yang diisolasi dari perairan laut di sekitar tambak atau perbenihan udang (Tjahjadi *et al.*, 1994). Selanjutnya Rosa *et al.* (1997) mengisolasi bakteri penghambat *V.*

*harveyi* dari air laut, air tambak, dan air pemeliharaan larva. Hala (1999) mengemukakan bahwa *V. metschnikovii* Z dan M yang diisolasi dari larva udang sehat efektif menghambat pertumbuhan dan pelekatan *V. carchariae* YA32.2 (patogen terhadap larva udang) dan dapat mengurangi jumlah larva udang yang mati. Haryanti *et al.* (2000) telah mengisolasi tiga isolat bakteri yang mampu menghambat pertumbuhan *V. harveyi* pada medium agar dalam cawan petri dan satu di antara tiga isolat tersebut mampu menekan pertumbuhan *V. harveyi* pada media pemeliharaan larva udang. Sedangkan Muliani *et al.* (2003), telah mengisolasi sedikitnya 15 isolat bakteri laut, baik dari sedimen, air, dan karang yang potensial menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi* patogen udang windu. Macey & Coyne (2005) dan Lehata *et al.* (2010) mengisolasi probiotik dari abalon, Merrifield *et al.* (2010) mengisolasi probiotik dari lingkungan budidaya ikan salmon, Avella *et al.* (2010) mengisolasi probiotik dari larva gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L), sedangkan Bjornsdottir *et al.*, (2010) mengisolasi probiotik dari larva ikan sebelah (Atlantic halibut).

Pemanfaatan bakteri-bakteri probiotik yang diisolasi dari berbagai sumber belum maksimal karena adanya beberapa kendala di antaranya optimalisasi pertumbuhan, kemampuan beradaptasi, dan konsistensi antivibrosis yang dimiliki belum diketahui. Kemampuan tumbuh dan berkembang suatu jenis bakteri probiotik sangat dipengaruhi oleh asal bakteri tersebut diisolasi. Untuk lebih mengoptimalkan pertumbuhan dan perkembangan probiotik yang digunakan pada budidaya udang windu, maka dicoba mengisolasi bakteri dari sedimen tambak. Menurut Poernomo (2004) bahwa probiotik yang diaplikasikan ke dalam tambak harus mampu hidup di dalam tambak, mampu tumbuh, mampu berkembang biak, dan mampu berfungsi/bekerja aktif pada bidang masing-masing sesuai yang diharapkan. Oleh karena itu, karakterisasi dan identifikasi baik secara fisiologi maupun biokimia serta evaluasi potensinya sebagai probiotik dari suatu jenis bakteri perlu dilakukan untuk lebih memaksimalkan penggunaannya sebagai probiotik di tambak. Penelitian bertujuan ini untuk mengetahui karakteristik, mengevaluasi potensinya sebagai probiotik, serta menentukan posisi relatif isolat BT951 melalui analisis gen 16S-rRNA.

## BAHAN DAN METODE

### Isolasi dan Karakterisasi Secara Morfologi

Sedimen tambak diambil menggunakan botol sampel steril kurang lebih 10 g, dimasukkan ke dalam *coolbox* dan selanjutnya dibawa ke laboratorium Patologi, Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau, Maros. Sedimen tambak ditimbang sebanyak 1 g, kemudian diencerkan dengan larutan fisiologis (NaCl 0,5%) secara berseri (bisa sampai  $10^{-4}$  tergantung kondisi sedimen tambak, semakin tinggi kadar bahan organik di dasar tambak maka tingkat pengenceran semakin tinggi, karena biasanya populasi bakterinya juga semakin tinggi). Selanjutnya dari setiap pengenceran diambil 100 mL dan disebar pada media *Tryptic Soy Agar* (TSA) dalam cawan petri, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 1-2 hari. Koloni bakteri yang tumbuh selanjutnya diidentifikasi berdasarkan bentuk, warna, elevasi, dan ukuran koloni bakteri yang terbentuk (Atlas, 1997; Prescott *et al.*, 2002). Bakteri yang tumbuh dimurnikan dan dikultur pada media TSA yang dimiringkan, diinkubasi selama 48 jam dan selanjutnya diuji secara fisiologi dan biokimia.

### Karakterisasi Fisiologi dan Biokimia

Karakterisasi fisiologi dan biokimia isolat BT951 yang dilakukan adalah pewarnaan gram, oksidase, katalase, indol, motilitas, aktivitas amilolitik, aktivitas protease, dan aktivitas kitinase (Hadioetomo, 1993; Muir, 1996).

### Identifikasi Isolat BT951 Secara Molekuler

Untuk menentukan identitas isolat BT951 berdasarkan sekuen 16S-rRNA, 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 *Sequencer*.

### Ekstraksi DNA

Isolat BT951 ditumbuhkan dalam media SWC kaldu. Kultur diinkubasi dalam *shaker water bath* pada suhu 28°C, 10.000 rpm selama

24 jam. Sel bakteri dipanen dengan mengambil 1 mL suspensi biakan bakteri, lalu dimasukkan ke dalam Eppendorf volume 1,5 mL. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 5 menit dan supernatannya dibuang. Hal ini dilakukan dua kali. Pelet bakteri yang terbentuk kemudian diresuspensi dengan 250 mL buffer 1xTE dan 2 mg/L lisozim, diinkubasi 37°C selama 30 menit. Selanjutnya ditambahkan SDS 10% sebanyak 50 mL dan 5 mL Proteinase-K, dibolak-balik sampai bening berlendir. Campuran ini diinkubasi pada suhu 37°C selama satu jam (tiap 15 menit dikocok). Setelah itu ditambahkan 65 mL NaCl 5 M, di bolak-balik sehingga tercampur dengan baik, kemudian ditambahkan 80 mL CTAB 10%. Dihomogenkan sampai berwarna putih susu, kemudian diinkubasi pada suhu 65°C selama 20 menit. Selanjutnya ke dalam campuran tersebut ditambahkan 650 mL phenol: chloroform:isoamyl alkohol (25:24:1), divortex selama 30 detik, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 5.000 rpm pada suhu ruang selama 10 menit. Supernatan diambil dengan mikro pipet dan dipindahkan ke dalam tabung Eppendorf steril yang telah diisi dengan 600 mL isopropanol dan dibolak balik sehingga timbul benang-benang DNA dan dibiarkan pada suhu ruang selama 30 menit. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm pada suhu ruang dan setelah itu supernatan dibuang. DNA dalam bentuk pelet dicuci dengan 300 mL ethanol 70%, disentrifugasi selama 5 menit pada suhu ruang dan setelah itu etanol dibuang. Pelet DNA dikering-udarkan atau dengan menggunakan pompa vakum untuk menguapkan etanol yang masih tersisa. Langkah terakhir dalam ekstraksi DNA adalah penambahan akuabides bebas nuklease atau buffer 1xTE atau Elution Buffer (EB) dan selanjutnya DNA disimpan pada suhu -20°C untuk keperluan selanjutnya.

#### **Amplifikasi Gen 16S-rRNA dengan PCR**

Sebelum dilakukan amplifikasi gen 16S-rRNA dengan PCR, terlebih dahulu dilakukan pengecekan terhadap DNA yang telah diekstrak melalui elektroforesis gel mini (Suwanto *et al.*, 2000) atau dengan gene Quant. Amplifikasi gen 16S-rRNA dengan PCR digunakan *Ready to Go* PCR Beads dengan komponen reaksi terdiri atas ddH<sub>2</sub>O 23 mL; DNA templet 0,5 mL; 1 mL 63f primer; dan 1 mL 1387r primer. Primer yang digunakan adalah primer universal untuk domain

bakteria berupa Forward primer 63f (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTA-3') dan reverse primer 1387r (GGGCGGWTGGTACAAGGC-3') (Marchesi *et al.* 1998; Suwanto *et al.*, 2000). Semua komponen reaksi dicampur dalam mikrotube dan selanjutnya di-*running*. Proses *running* pada PCR dilakukan dalam 30 siklus, di mana masing-masing siklus terdiri atas tahap *pre start* pada suhu 94°C selama 2 menit, tahap denaturasi DNA utas ganda pada suhu 92°C selama 30 detik, tahap *annealing* pada suhu 55°C selama 30 detik, dan tahap perpanjangan pada suhu 75°C selama 1 menit, tahap post PCR pada suhu 75°C selama 20 menit, dan tahap stop PCR pada suhu 4°C. Selanjutnya hasil PCR disimpan pada suhu -20°C (Suwanto *et al.*, 2000).

#### **Pemurnian DNA**

Pada tahapan ini DNA yang telah di-amplifikasi dengan PCR di "running" dalam elektroforesis kemudian dimurnikan dengan metode *Glass milk*.

#### **Cycle Sequencing, Presipitasi, dan Sekuensing DNA**

Pada tahapan ini pereaksi dan langkah kerja dilakukan berdasarkan metode yang dilaporkan oleh Marchesi *et al.* (1998) yang telah dimodifikasi oleh Suwanto *et al.* (2000).

#### **Evaluasi Potensi Isolat BT951 sebagai Probiotik**

##### **Uji Sensitivitas terhadap Antibiotik**

Isolat BT951 diuji sensitivitasnya terhadap beberapa jenis antibiotik di antaranya; gentamisin, klorampenikol, eritromisin, furazolidon, dan rifampisin pada konsentrasi 25 mg/mL. Setiap jenis antibiotik tersebut dicampurkan dalam media SWC 100% (air laut 750 mL, akuades 250 mL, bakto pepton 5 g, ekstrak khamir 1 g, gliserol 3 mL, dan bakto agar 15 g). Penambahan antibiotik ke dalam media SWC dilakukan setelah media disterilkan dan suhunya sekitar 50°C, selanjutnya di tuang ke dalam cawan petri. Media tersebut selanjutnya digunakan sebagai media biakan isolat BT951. Sensitivitas isolat BT951 terhadap antibiotik yang digunakan ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan isolat tersebut pada media yang telah dibubuhi dengan antibiotik, setelah 48 jam masa inkubasi.

### Uji Daya Hambat Isolat BT951 terhadap *V. harveyi*

Bakteri *V. harveyi* MR5339 ditumbuhkan pada medium TCBSA (*Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar*) selama 24 jam. Koloni tunggal yang tumbuh diambil dengan jarum Ose dan disuspensikan dalam larutan garam fisiologis (0,85% (w/v) NaCl). Kemudian disebar pada media SWC 100% dalam cawan petri, selanjutnya ditaruh *paper disk* steril yang berdiameter 7 mm. *Paper disk* ditetesi dengan biakan isolat BT951 sebanyak 10-20 L (konsentrasi biakan dalam suspensi sekitar  $10^8$ - $10^9$  cfu/mL). Kemudian diinkubasi pada suhu 28°C selama 24-48 jam, setelah itu zona hambatan yang terbentuk diukur dengan mistar penggaris pada tiga posisi dan selanjutnya diratakan.

### Uji Patogenisitas Isolat BT951 terhadap Larva Udang

Konsentrasi isolat BT951 yang digunakan pada uji patogenisitas adalah  $10^6$  CFU/mL dengan metode perendaman (Hameed, 1995). Wadah yang digunakan adalah stoples kaca berkapasitas 3 L yang diisi air laut steril dengan kadar garam 28 ppt sebanyak 2 L dan ditebahi dengan larva udang sebanyak 25 ekor/wadah.

Untuk menjaga ketersediaan oksigen, wadah pemeliharaan larva dilengkapi dengan aerasi. Patogenisitas isolat BT951 terhadap larva udang windu diamati melalui kematian larva udang setelah 24 jam perendaman (Rengpipat *et al.*, 1998) dan dibandingkan dengan kontrol.

### Uji Tantang Isolat BT951 dengan *V. harveyi*

#### ● Uji Tantang Secara *In vitro*

Uji tantang secara *In vitro* dilakukan dengan menggunakan media SWC kaldu 100% (air laut 750 mL, akuades 250 mL, bakto pepton 5 g, ekstrak khamir 1 g, gliserol 3 mL) dalam labu erlemeyer. Kepadatan bakteri *V. harveyi* dibuat menjadi  $10^7$  CFU/mL (Rengpipat *et al.*, 1998) dan kepadatan bakteri BT951 dibuat menjadi  $10^2$ ,  $10^4$ , dan  $10^6$  CFU/mL (Tjahjadi, 1994; Hala, 1999; Muliani *et al.*, 2003). Biakan bakteri BT951 dimasukkan ke dalam media SWC kaldu sesuai dengan kepadatan yang telah ditentukan, dan selanjutnya biakan *V. harveyi* dimasukkan ke dalam media tersebut. Biakan kedua bakteri ini dikultur selama 96 jam pada

suhu ruang dalam inkubator bergoyang. Populasi *V. harveyi* menggunakan media SWC 100% yang telah ditambah rifampisin sebagai media selektif.

#### ● Uji Tantang Secara *In vivo*

Uji tantang secara *In vivo* dilakukan di dalam akuarium kaca yang berkapasitas 3 L. Wadah tersebut diisi air laut steril dengan kadar garam 28 ppt sebanyak 2 L, dan ditebahi larva udang stadia PL7 sebanyak 25 ekor/wadah. Perlakuan dalam penelitian ini terdiri atas A) Isolat BT951 dengan kepadatan  $10^2$  CFU/mL, B) Isolat BT951 dengan kepadatan  $10^4$  CFU/mL, C) Isolat BT951 dengan kepadatan  $10^6$  CFU/mL, D) Kontrol (*V. harveyi*  $10^7$  CFU/mL tanpa BT951). Masing-masing perlakuan diulang tiga kali. Pengamatan populasi bakteri dan sintasan larva udang windu diamati setelah 96 jam.

### Uji Ketahanan Isolat BT951 pada Suhu Ruang dan Suhu 4°C

Bakteri isolat BT951 ditumbuhkan pada media biakan murni atau media kaldu murni (*nutrient broth*). Wadah yang digunakan untuk menumbuhkan isolat BT951 adalah gelas Erlenmeyer 250 mL. Biakan ditumbuhkan pada suhu ruang sambil digoyang pada inkubator bergoyang selama 24 jam kemudian di-*sampling* sebagai data pertumbuhan awal. Untuk menjaga agar tidak terjadi kontaminasi, maka biakan dibagi ke dalam botol kecil yang steril dan disimpan pada suhu ruang dan suhu 4°C. Jumlah botol kecil yang berisi biakan isolat BT951 disesuaikan dengan frekuensi *sampling* sehingga setiap dilakukan *sampling* biakan untuk *sampling* berikutnya tidak terganggu, dan biakan yang tersisa setelah di-*sampling* langsung dimusnahkan.

Penyimpanan isolat BT951 dilakukan selama 10 bulan, dan dilakukan *sampling* pertumbuhan satu kali dalam sebulan.

## HASIL DAN BAHASAN

### Morfologi BT951

Morfologi isolat BT951 disajikan pada Gambar 1. Pada Gambar 1 terlihat bahwa koloninya berbentuk bulat kecil, berwarna krem kekuningan, tepian licin, dan cembung (Prescott *et al.*, 2002). Pada media TSA bakteri ini pertumbuhannya agak lambat yaitu sekitar 72 jam masa inkubasi.





Gambar 1. Koloni isolat BT951 setelah 72 jam inkubasi pada media TSA

Figure 1. Colony of BT951 isolate after 72 hours incubation on TSA media

#### Sifat Fisiologi dan Biokimiawi Isolat BT951

Beberapa sifat fisiologi dan biokimia isolat BT951 disajikan pada Table 1. Pada Tabel 1 terlihat bahwa isolat BT951 termasuk kelompok bakteri gram positif yang berbentuk batang, Oksidase dan katalase positif, indol negatif, dan bersifat motil. Bakteri ini dapat tumbuh pada suhu 40°C, tumbuh pada media yang dibubuhi NaCl 0-10%. Bakteri ini sensitif terhadap beberapa jenis antibiotik seperti rifampisin, eritromisin, dan clorampenikol, akan tetapi resisten terhadap ampisilin, oksitetrasiklin, gentamisin, dan furazolidon. Populasi bakteri ini pada salinitas 0-30 ppt setelah 24 jam mencapai  $10^4$  CFU/mL, namun pada salinitas yang lebih tinggi yaitu 40-50 ppt sedikit menurun yaitu  $10^3$  CFU/mL.

#### Identifikasi Isolat BT951 Secara Molekuler

Dari hasil analisis gen 16S-rRNA dapat diketahui bahwa isolat BT951 termasuk kelompok *Brevibacillus laterosporus* dengan indeks kedekatan sebesar 97,7%. Bakteri ini termasuk dalam kingdom bakteri, Divisi Firmicutes, Kelas Bacilli, Ordo Bacillus, Family Paenibacillaceae, Genus *Brevibacillus*, species *Brevibacillus laterosporus*. Jenis bakteri ini banyak digunakan sebagai biokontrol untuk di bidang pertanian. Menurut Oliveira *et al.* (2004), *Brevibacillus laterosporus* potensial sebagai agen biologi kontrol.

#### Hasil Uji Patogenisitas terhadap Larva Udang Windu

Hasil uji patogenesis isolat BT951 terhadap larva udang windu menunjukkan bahwa hingga kepadatan  $10^6$  CFU/mL tidak bersifat patogen terhadap larva udang windu. Hal ini dapat diketahui dari sintasan udang windu yang dihasilkan mencapai 96% sedikit lebih tinggi dibanding dengan sintasan udang windu pada bak yang tidak menggunakan probiotik yaitu 92%. Beberapa hasil penelitian sebelumnya menunjukkan hal yang serupa, di mana bakteri yang diisolasi dari air laut dan tambak yang potensial sebagai probiotik tidak bersifat patogen pada larva udang windu. Rosa *et al.* (1997) melaporkan bahwa pada kepadatan  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  dan  $10^8$  cfu/mL selama 24 jam perendaman semua bakteri kandidat biokontrol yang diuji patogenisitasnya tidak bersifat patogen pada larva udang windu. Demikian pula yang dihasilkan oleh Haryanti *et al.* (2000), isolat BY-9 sebagai biokontrol tidak bersifat patogen pada larva udang windu setelah inkubasi 12 jam pada konsentrasi  $10^5$  CFU/mL. Beberapa isolat bakteri kandidat probiotik yang disolasi dari sedimen karang (Muliani *et al.*, 2003) dan daun mangrove (Muliani *et al.*, 2004) juga dilaporkan tidak patogen pada larva udang windu. Widanarni *et al.* (2010) melaporkan bahwa ketiga isolat kandidat probiotik (isolat U, isolat 9, dan isolat P17B<sub>0</sub>) yang diuji patogenisitasnya pada konsentrasi  $10^6$  CFU/mL terhadap larva udang windu hingga hari ke-5 tidak patogen terhadap larva udang windu.

#### Hasil Uji Daya Hambat Isolat BT951 terhadap *V. harveyi*

Hasil uji daya hambat isolat BT951 terhadap *V. harveyi* disajikan pada Gambar 2. Pada Gambar 2 terlihat bahwa isolat BT951 mampu menghambat pertumbuhan *V. harveyi* yang ditandai dengan adanya zona bening di sekitar koloni BT951.

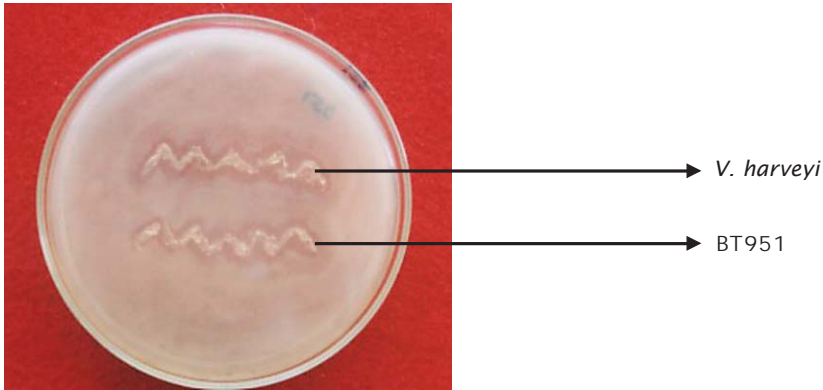
#### Hasil Uji Tantang Secara *In vitro*

Hasil ujiantang secara *In vitro* antara BT951 dengan *V. harveyi* disajikan pada Gambar 3. Pada gambar tersebut terlihat bahwa populasi *V. harveyi* pada perlakuan yang menggunakan isolat BT951 lebih rendah dibanding dengan populasi *V. harveyi* pada perlakuan yang tidak menggunakan isolat BT951 (kontrol), baik pada perlakuan yang

Tabel 1. Karakteristik fisiologi dan biokimia isolat BT951

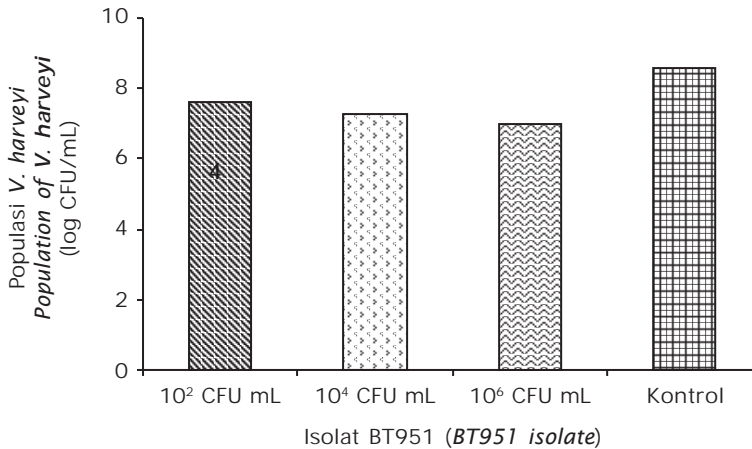
Table 1. Physiological and biochemical characterization of BT951 isolate

Uji fisiologi dan biokimia <i>Physiological and biochemical tests</i>	Isolat BT951 <i>BT951 isolate</i>
Uji hambat terhadap <i>V. harveyi</i> ( <i>Inhibition test of BT951 against V. harveyii</i> )	+
Pertumbuhan pada media SWC yang dibubuhi antibiotik 50 mg/mL	+
	Ampisilin 50 (mg/mL)
	Eritromidsin 50 (mg/mL)
	Rifampisin 50 (mg/mL)
<i>Growth on SWC media supplemented with 50 mg/mL of antibiotic</i>	-
	Oxitetrasiklin 50 (mg/mL)
	Gentamisin 50 (mg/mL)
	Furazolidon 50 (mg/mL)
	Chloramphenikol 50 (mg/mL)
Pertumbuhan pada beberapa konsentrasi NaCl	+
	0%
<i>Growth on several concentrations of NaCl</i>	+
	0.01%
	0.10%
	1%
	10%
Pertumbuhan pada salinitas yang berbeda setelah 24 jam	+
<i>Growth on different salinities after 24 hours</i>	1.0x10 <sup>4</sup>
	0 ppt
	10 ppt
	2.5x10 <sup>4</sup>
	20 ppt
	1.0x10 <sup>4</sup>
	30 ppt
	1.0x10 <sup>4</sup>
	40 ppt
	1.0x10 <sup>3</sup>
	50 ppt
	3.1x10 <sup>3</sup>
Pewarnaan gram ( <i>Gram staining</i> )	+
Oksidase ( <i>Oxidase</i> )	+
Katalase ( <i>Catalase</i> )	+
Motilitas ( <i>Motility</i> )	-
Indol ( <i>Indole</i> )	-
Uji VP ( <i>VP-test</i> )	-
Pertumbuhan pada suhu 40°C ( <i>Growth at 40°C</i> )	+
Pertumbuhan pada etanol 95% ( <i>Growth at 95% ethanol</i> )	-
Produksi gas ( <i>Gas from glucose</i> )	-
Uji O-F ( <i>O-F test</i> )	-
Penyebaran ( <i>Swarming</i> )	-
Pendaran ( <i>Luminescence</i> )	-
Produksi amilase ( <i>Amilolytic</i> )	-
Produksi protease (Proteolytic)	+
Arginin dehidr ( <i>Arginine dehydr</i> )	-
Lisin dekarb ( <i>Lysine decarb</i> )	+
Ornitin dekarb ( <i>Ornithine decarb</i> )	+
Serin ( <i>Serine</i> )	-
Putrisin ( <i>Putriscine</i> )	-
Sukrosa ( <i>Sucrose</i> )	-
Heptanoat ( <i>Heptanoate</i> )	-
Xantin ( <i>Xanthine</i> )	-
Amonobutirat ( <i>Aminobutirate</i> )	-
Arabinosa ( <i>Arabinose</i> )	-
Sellubiosa ( <i>Cellubiose</i> )	-
Glukuronata ( <i>Glucuronate</i> )	-
Ketoglutarat ( <i>Cetoglutarate</i> )	-



Gambar 2. Hasil uji daya hambat isolat BT951 dengan *V. harveyi* dengan metode goresan

Figure 2. Test result of BT951 inhibition to *V. harveyi* by scratch method



Gambar 3. Populasi *V. harveyi* (log CFU/mL) yang ditantang dengan isolat BT951 pada konsentrasi yang berbeda

Figure 3. Population of *V. harveyi* (log CFU/mL) challenged with BT951 isolate

menggunakan isolat BT951 dengan konsentrasi 10<sup>2</sup>CF/mL, 10<sup>4</sup> CFU/mL, maupun pada 10<sup>6</sup> CFU/mL. Hal ini menunjukkan bahwa isolat Bt951 mampu menekan perkembangan populasi bakteri *V. harveyi* dalam wadah pemeliharaan udang windu.

#### Sintasan Udang pada Uji Tantang Secara *In vivo*

Sintasan udang windu pada uji tantang secara *In vivo* disajikan pada Tabel 2. Pada Tabel 2 terlihat bahwa sintasan larva udang windu tertinggi pada penggunaan BT951

dengan konsentrasi 10<sup>2</sup> CFU/mL. Meskipun demikian hasil uji statistik menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang nyata ( $P > 0,05$ ) terhadap sintasan larva udang windu baik yang diberi isolat BT951 maupun tanpa pemberian isolat BT951. Hal ini menunjukkan bahwa isolat BT951 dapat dijadikan sebagai probiotik pada budidaya udang windu.

Berdasarkan hasil sekuensing gen 16S-rRNA, isolat BT951 termasuk dalam kelompok *Brevibacillus*. Poernomo (2004) melaporkan bahwa bahwa *Bacillus* sp. merupakan salah satu jenis bakteri yang telah diproduksi secara

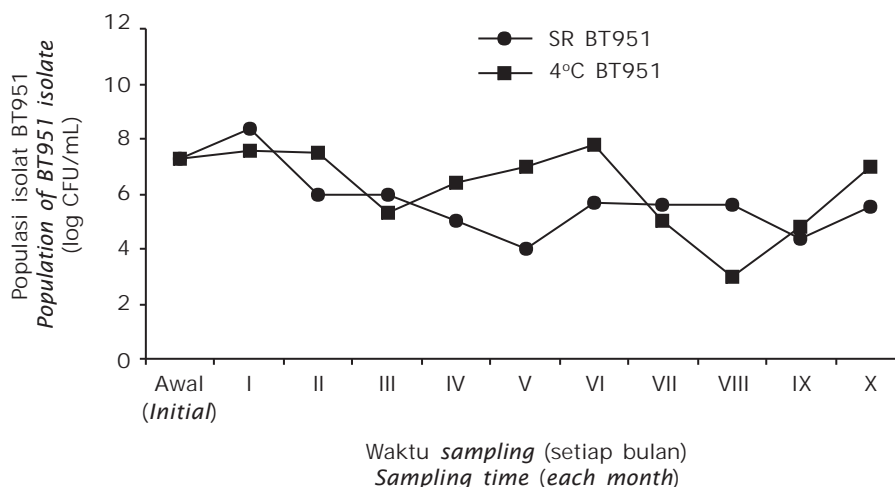


Tabel 2. Sintasan benur windu (%) dalam ujiantang secara *In vivo* antara bakteri kandidat probiotik dengan *V. harveyi*

Table 2. Survival rate of tiger shrimp postlarvae (%) in vivo challenge between probiotic candidate bacteria with *V. harveyi*

Perlakuan <i>Treatments</i>	Sintasan larva udang windu (%) <i>Survival rate (%) of tiger shrimp larvae</i>
BT951 (10 <sup>2</sup> CFU/mL)	95.67 <sup>a</sup>
BT951 (10 <sup>4</sup> CFU /mL)	87.78 <sup>a</sup>
BT951 (10 <sup>6</sup> CFU /mL)	86.67 <sup>a</sup>
Kontrol/ <i>Control</i>	94.44 <sup>a</sup>

Nilai yang diikuti superscript serupa dalam kolom yang sama tidak berbeda nyata (*The values followed by the same superscript in the same column were not significantly different*) (P>0.05)



Gambar 4. Populasi isolat BT951 pada penyimpanan dengan suhu yang berbeda  
Figure 4. Population of BT951 isolate stored at different temperatures

komersil dan diaplikasikan di lapangan sebagai probiotik.

#### Ketahanan BT951 pada Penyimpanan dengan Suhu yang Berbeda

Isolat BT951 yang disimpan pada suhu ruang ( $\pm 28^\circ\text{C}$ ) selama 10 bulan penyimpanan mengalami penurunan, namun demikian secara keseluruhan tidak berbeda jauh dengan yang disimpan pada suhu  $4^\circ\text{C}$ . Hal ini menunjukkan bahwa dalam kondisi tidak ada alat pendingin (kulkas) isolat BT951 sebagai probiotik masih bisa disimpan pada kondisi suhu ruangan ( $\pm 28^\circ\text{C}$ ). Ini berarti jika bakteri ini diproduksi sebagai bakteri probiotik, maka

bakteri ini dapat dikemas dalam bentuk probiotik cair dan dapat disimpan pada kondisi suhu ruangan, sehingga mudah penanganannya dan dapat digunakan di masyarakat.

Pada umumnya probiotik komersil cair yang beredar di pasaran hanya mencapai  $10^3$  CFU/mL sebelum difermentasi meskipun pada labelnya tertera bahwa populasi probiotik tersebut mencapai  $10^{11}$ - $10^{12}$  CFU/mL. Hal ini menunjukkan bahwa selama proses penyimpanan populasi probiotik mengalami penurunan. Gunarto *et al.* (2006) melaporkan bahwa populasi bakteri probiotik komersil (Super NB) yang dikemas dalam larutan stok sebelum difermentasi sebesar  $10^3$  CFU/mL dan

setelah difermentasi menggunakan tepung ikan, dedak halus, ragi, dan molase maka populasinya meningkat menjadi  $10^{10}$ - $10^{12}$  CFU/mL.

## KESIMPULAN

Isolat BT951 termasuk kelompok gram positif, berbentuk batang, *Brevibacillus laterosporus*, tidak bersifat patogen terhadap udang windu, dapat menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi*, dan potensial sebagai bakteri probiotik pada budidaya udang windu.

## DAFTAR ACUAN

- Ahmad, T., Suryati, E., & Muliani. 1995. Screening sponge for bactericide to be use in shrimp culture. *Ind. Fish. Res. J.*, 1: 1-10.
- Atlas, R.M. 1997. Hand Book of Microbiological media. 2<sup>nd</sup> edition. CRC Press. Boca Raton. New York. London. Tokyo, 1706 pp.
- Austin, B. & Day, J.G. 1990. Inhibition of prawn pathogenic *Vibrio* spp. By a commercial spray-dried preparation of *Tetraselmis suecica*. *Aquaculture*, 90: 389-392.
- Avella, M.A., Giocchini, G., Decamp, O., & Markidis, P. 2010. Application of multispecies of Bacillus in sea bream larviculture. *Aquaculture*, 305:12-19.
- Balasubramanian, G., Sarathi, M., Venkatesan, C., Thomas, J., & Hameed, A.S.S. 2008. Oral administration of antifiral plant extract of cynodon dactylon on a large scale production against White Spote Syndorome Virus (WSSV) in *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 279: 2-5.
- Bjornsdottir, R., Karadottir, E.G., Johannsdottir, J., Thorarinsdottir, E.E., Smaradottir, H., Sigurgisladdottir, S., & Gudmundsdottir, B. K. 2010. Selection of Bacteria and the effects of bacterial treatment of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) eggs and larvae. *Aquaculture*, 302: 219-227.
- Chanratchakool, P., Turnbull, J. F., Smith, S. F., & Limsuwan, C. 1995. Health management in shrimp ponds. 2<sup>nd</sup> Edition. Aquatic Animal Health Research Institute. Department of Fisheries. Kasetsart University Campus. Bangkok, 111 pp.
- Devaraja, T.N., Otta, S.K., Shubha, G., Karunasagar, I., Tauro, P., & Karunasagar, I. 1998. Immunostimulation of shrimp through oral administration of *Vibrio* bacteri and yeast glucan. In Flegel TW. (Ed.) Advances in shrimp biotechnology. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, p. 167-170.
- Devaraja, T.N., Yussoff, F. M., & Shariff, M. 2002. Changes in bacterial populations and shrimp production in ponds treated with commercial microbial products. *Aquaculture*, 206: 245-256.
- Gunarto, Tampangallo, B.R., & Susianingsih, E. 2006. Pemeliharaan udang windu, *Penaeus monodon* di laboratorium dengan penambahan probiotik hasil perbanyakan. Dalam Taufiqurrohman, M., Prayogi, U., Gimam, Winarno, A. *Prosiding Seminar Nasional Kelautan III*. Universitas Hang Tuah. 24 April 2006. Surabaya, hlm. 26-33.
- Hadioetomo, R.S. 1993. Mikrobiologi dasar dalam praktek: Teknik dan prosedur dasar laboratorium. PT Gramedia, Jakarta, hlm. 62-68.
- Hala, Y. 1999. *Penggunaan gen penanda molekular untuk deteksi pelekatan dan kolonisasi vibrio harveyi pada larva udang windu (Penaeus monodon)* [Disertasi]. Bogor. Institut Pertanian Bogor, Program Pascasarjana, 91 hlm.
- Hameed, A.S.S. 1995. Susceptibility of three *Penaeus* species to a *Vibrio campbelli*-like bacterium. *J. World Aqua. Soc.*, 26: 315-319.
- Haryanti, Sugama, K., Tsamura, S., & Nishijima, T. 2000. Vibriostatic bacterium isolated from seawater: Potentiality as probiotic agent in the rearing of *Penaeus monodon* larvae. *Ind. Fish. Res. J.*, 6: 26-32.
- Iehata, S., Inagaki, T., Okunishi, S., Nakano, M., Tanaka, R., & Maeda, H. 2010. Improve gut enviroment of abalone *Haliotis gigantea* through *Pseudococcus* sp. Ah1. treatment. *Aquaculture*, 305: 59-65
- Itami, T. & Takahashi, Y. 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.
- Karunasagar, I., Pai, R., Malathi, G.R., & Karunasagar, I. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*, 128: 203-209.
- Lavilla-Pitogo, C.R., Albright, L. J., & Paner, M.G. 1998. Will microbial manipulation sustain the ecological balance in shrimp (*Penaeus monodon*) Hatcheries? In Flegel TW. (Ed). Advances in shrimp biotechnology. Na-

- tional Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, p. 185-192.
- Leonardo, V.A.D., Bonnichon, V., Roch, F., Parrinello, N., & Bonami, J.R. 2005. Comparative WSSV infection route in the shrimp genera *Marsupenaeus* and *Palaemon*. *Aquaculture*, 28: 565-569.
- Macey, B.M. & Coyne, V.E. 2005. Improve growth rate and resistance in farmed *Haliotis midae* through Probiotic treatment. *Aquaculture*, 245: 249-261.
- Maeda, M. 1999. Microbial proses in aquaculture. National Research Institute of Aquaculture. Nansei, Mie. 516-0193. Japan, 102 pp.
- Marchesi, J., Sato, R.T., Weightman, A.J., Martin, T.A., Fry, J.C., Hiom, S.J., & Wade, W.G. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-spesifik PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S-rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 795-799.
- Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, J., Baker, R.T.M., Bogwld, J., Castex, M., & Ringo, E. 2010. The current status and future focus of probiotic and prebiotic application for salmonids. *Aquaculture*, 302: 1-18.
- Muir, P. 1996. Identification of *Vibrio* and *Pseudomonas* bacteria. Department of Microbiology, Biomedical and Tropical Veterinary Science. James Cook University of North Queensland. Australia, 6 pp.
- Muliani, Atmomarsono, M., & Madeali, M.I. 1998a. Pengaruh penggunaan kekerangan sebagai biofilter terhadap kelimpahan dan komposisi jenis bakteri pada budidaya udang windu (*Penaeus monodon*) dengan sistem resirkulasi air. *J. Pen. Perik. Indonesia*, 3: 54-61.
- Muliani, Suryati, E., & Ahmad, T. 1998b. Penggunaan ekstrak spons untuk penanggulangan bakteri *Vibrio* spp. pada udang windu *Penaeus monodon*. *J. Pen. Perik. Indonesia*, 1: 108-115.
- Muliani, Suwanto, A., & Hala, Y. 2003. Isolasi dan karakterisasi bakteri asal laut Sulawesi untuk biokontrol penyakit vibriosis pada larva udang windu (*Penaeus monodon* Fab.). *Hayati*, 10: 6-11.
- Muliani, Nurbaya, Tompo, A., & Atmomarsono, M. 2004. Eksplorasi bakteri filosfer dari tanaman mangrove sebagai bakteri probiotik pada budidaya udang windu *Penaeus monodon*. *J. Pen. Perik. Indonesia*, 2: 47-57.
- Oclarit, J.M., Ohta, S., Kamimura, K., Yamaoka, Y., & Ikegami, S. 1994. Production of an antibacterial agen, *o*-Aminiphenol, by a bacterium isolated from marine sponge, *Adocia* sp. *Fish. Sci.*, 60: 559-562.
- Oliveira, E.J.D., Rabinovitch, L., Monnerat, R.G., Passos, L.K.J., & Zahner, V. 2004. *Appl. Environ. Microbiol.*, 11: 6657-6664.
- Prescott, L.M., Harley, J.P., & Klein, D.A. 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, 1026 pp.
- Poernomo, A. 2004. Technology of probiotics to solve the problems in shrimp pond culture and the culture environment. *Paper presented in the National Symposium on Development and Scientific and Technology Innovation in Aquaculture*, Semarang, January 27-29, 2004, 24 pp.
- Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S., & Menasveta, P. 1998. Probiotics in Aquaculture: A case study of probiotics for larvae of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). In Flegel TW. (Ed). Advances in shrimp biotechnology. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, p. 177-181.
- Rosa, D., Zafran, Taufik, I., & Girsang, M.A. 1997. Pengendalian *Vibrio harveyi* secara biologis pada larva udang windu (*Penaeus monodon*): I. Isolasi Bakteri Penghambat. *J. Penel. Perik. Indonesia*, 3: 1-10.
- Salfira. 1998. *Pengaruh pemberian LPS (Lipopolisakarida) dari dinding sel bakteri Vibrio harveyi terhadap gambaran sistem kekebalan Non-spesifik pada udang windu (Penaeus monodon Fab.)* [Tesis]. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Sung, H.H., Kou, G.H., & Song, Y.L. 1994. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathol.*, 1: 11-17.
- Suryati, E., Rosmiati, Moka, W., & Hala, Y. 2000. Hydrozoan *Aglaophenia* sp. Bioactive Substance Analysis for Bactericide. *Ind. Fish. Res. J.*, 6: 55-61.
- Supamattaya, K., Kiriratnikom, S., Boonyaratpalin, M., & Borowitzka, L. 2005. Effect of a Dunaliella extract on growth performance, health condition, immun

- respon and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture*, 248: 207-216.
- Suwanto, A., Yogiara, Suryanto, D., Tan, I., & Puspitasari, E. 2000. Selected protocols. Training Course on Advances in Molecular Biology Techniques to Assess Microbial Diversity. Bogor, 28 pp.
- Tjahjadi, M.R, Angka, S.L., & Suwanto, A. 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., Hernandez-Lopez, J., Gallas-Galvan, T., Montano-Perez, K., Jimenez-Vega, F., & Yepiz-Plascencia, G. 1998. Activation of shrimp cellular defence functions by microbial products. *In* Flegel TW. (Ed). Advances in shrimp biotechnology. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, p. 161-166.
- Widanarni, Rajab, F., Sukenda, & Setiawati, M. 2010. Isolasi dan seleksi bakteri probiotik dari lingkungan tambak dan hatcheri untuk pengendalian penyakit vibriosis pada larva udang windu, *Penaeus monodon*. *J. Ris. Akuakultur*, 5: 103-113.