

## MEKANISME PENGHAMBATAN BAKTERI PROBIOTIK TERHADAP PERTUMBUHAN *Vibrio harveyi* PADA LARVA UDANG WINDU (*Penaeus monodon*)

### Inhibitory Mechanism of Probiotic Bacteria on The Growth of *Vibrio harveyi* in Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) Larvae

Widanarni<sup>1</sup>, E. Ayuzar<sup>2</sup> dan Sukenda<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor

<sup>2</sup>Jurusan Budidaya Perairan, Fakultas Pertanian, Universitas Malikussaleh

#### ABSTRACT

Three probiotics named SKT-b, 1Ub, and Ua had inhibitory activity against the growth of *Vibrio harveyi*. These strains were mutated by rifampicin resistant. The inhibitory effect of SKT-b, 1Ub, and Ua on the growth of *V. harveyi* was investigated by concomitant incubation of the two bacteria in a culture shrimp larvae. Colony forming unit of *V. harveyi*, probiotic and total of bacteria in dead, live larvae and water culture was monitored, and survival rate of larvae was investigated. Shrimp inoculated probiotic previously had survival rate higher than control (without probiotic). Number of *V. harveyi* in treatment without probiotic inoculation also higher compared to treatment with probiotic inoculation in dead, live larvae and water culture. It demonstrated possible inhibition of probiotic bacteria on *V. harveyi* through competition for adherence sites or nutrition source. Partial sequencing of 16S-rRNA gene showed that 1Ub was similar to *Pseudoalteromonas piscicida*, whereas SKT-b and Ua were similar to *Vibrio alginolyticus*.

Keywords: probiotic bacteria, inhibitory mechanism, *V. harveyi*, tiger shrimp

#### ABSTRAK

Tiga isolat bakteri probiotik yaitu 1Ub, SKT-b dan Ua telah diuji memiliki aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan *V. harveyi* secara *in vitro*. Ketiga isolat ini kemudian diberi penanda resisten rifampisin ( $Rf^R$ ) melalui mutasi spontan untuk mempelajari mekanisme penghambatannya pada larva udang windu. Efek penghambatan dari 1Ub, SKT-b dan Ua terhadap pertumbuhan *V. harveyi* diamati melalui pemberian secara bersamaan antara bakteri probiotik dan *V. harveyi* tersebut dalam air pemeliharaan larva udang. Jumlah sel bakteri probiotik, *V. harveyi* dan total bakteri baik pada larva mati, larva hidup dan air pemeliharaan diamati dan kelangsungan hidup larva dihitung. Nilai kelangsungan hidup udang pada perlakuan yang diinokulasi bakteri probiotik lebih tinggi daripada kontrol (tanpa penambahan bakteri probiotik). Jumlah sel *V. harveyi* pada perlakuan tanpa penambahan probiotik juga lebih tinggi, dibanding pada perlakuan dengan penambahan probiotik baik pada larva mati, larva hidup maupun air media pemeliharaan. Hal ini menunjukkan adanya penghambatan bakteri probiotik terhadap *V. harveyi* yang kemungkinan melalui kompetisi tempat pelekatan atau sumber nutrisi. Hasil analisis sekuen sebagian gen 16-rRNA menunjukkan bahwa isolat 1Ub termasuk spesies *Pseudoalteromonas piscicida*, sedangkan SKT-b dan Ua termasuk spesies *Vibrio alginolyticus*.

Kata kunci: bakteri probiotik, mekanisme penghambatan, *V. harveyi*, udang windu

#### PENDAHULUAN

Serangan penyakit dan penurunan kualitas lingkungan budidaya merupakan masalah yang timbul dalam usaha pembenihan udang. Salah satu penyakit udang yang membahayakan adalah penyakit udang berpendar atau *luminescent vibriosis* yang disebabkan oleh *Vibrio harveyi*. *V.*

*harveyi* dapat menyerang udang pada berbagai stadia mulai dari nauplius, zoea, mysis dan post larva di pembenihan hingga udang dewasa di tambak pembesaran (Saulnier *et al.*, 2000).

Salah satu alternatif untuk menanggulangi permasalahan penyakit vibriosis adalah dengan menggunakan bakteri probiotik sebagai biokontrol yang

dapat menghambat pertumbuhan *V. harveyi*. Bakteri probiotik yang digunakan sebagai biokontrol dapat diisolasi dari tambak atau pembenihan udang (Tjahjadi *et al.*, 1994; Haryanti *et al.*, 2000), air dan sedimen laut (Muliani *et al.*, 2003) atau invertebrata laut seperti sponge (Suryati *et al.*, 2004) serta terumbu karang (Proksch, 2000).

Tiga isolat bakteri kandidat probiotik koleksi Laboratorium Kesehatan Ikan, Departemen Budidaya Perairan, IPB yakni 1Ub (Tepu, 2006), SKT-b (Widanarni *et al.*, 2003) dan Ua (Razab, 2006) telah diuji mampu menghambat pertumbuhan *V. harveyi* secara *in vitro* dan dapat meningkatkan kelangsungan hidup larva udang windu pada uji *in vivo*. Untuk mempelajari mekanisme aksi bakteri probiotik tersebut dalam menghambat pertumbuhan *V. harveyi* pada larva udang dilakukan dengan memberikan penanda molekuler pada bakteri probiotik dan patogen, sehingga keberadaan bakteri tersebut pada larva udang dapat diamati. Penanda resistensi terhadap antibiotik rifampisin (Rf<sup>R</sup>) merupakan suatu pilihan karena bakteri asal laut pada umumnya sensitif terhadap rifampisin (Tjahjadi *et al.*, 1994). Selain itu mutan resisten rifampisin bersifat stabil pada media tanpa penambahan antibiotik (Hala *et al.*, 2000) sehingga dapat digunakan ujiantang pada jangka waktu lama. Dengan penanda molekuler tersebut, bakteri uji juga dapat dibedakan dari bakteri lain yang sebelumnya telah terdapat pada larva udang atau air media pemeliharaannya. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari mekanisme penghambatan bakteri probiotik terhadap pertumbuhan *V. harveyi* patogen pada larva udang windu (*Penaeus monodon*).

## METODE PENELITIAN

### Sumber Isolat Bakteri Probiotik

Isolat probiotik yang digunakan dalam penelitian ini adalah 1Ub (Tepu, 2006), Ua (Razab, 2006) dan SKT-b (Widanarni *et al.*, 2003). Ketiga isolat tersebut telah diuji mampu menghambat pertumbuhan *V. harveyi* patogen pada uji *in vitro* serta dapat

meningkatkan kelangsungan hidup larva udang windu.

### Uji *In Vivo* Bakteri Probiotik pada Larva Udang

Tiga isolat bakteri probiotik dengan konsentrasi akhir 10<sup>6</sup> CFU/ml dimasukkan kedalam wadah pemeliharaan udang sehari setelah larva udang dimasukkan. Setelah kokultivasi dengan larva udang selama 6 jam, *V. harveyi* MR5339 Rf<sup>R</sup> dimasukkan dengan konsentrasi 10<sup>6</sup> CFU/ml. Pengamatan dilakukan selama 10 hari, dan larva yang mati dihitung setiap hari. Pada akhir percobaan dihitung tingkat kelangsungan hidup dan pertumbuhan larva.

### Pembuatan Mutan Bakteri Probiotik Resisten Rifampisin (Rf<sup>R</sup>)

Pembuatan bakteri probiotik Rf<sup>R</sup> dilakukan melalui mutasi spontan dengan menyebar 1 ml suspensi bakteri probiotik sensitif rifampisin pada media *seawater complete* (SWC) agar (5 g bactopectone, 1 g yeast extract, 3 ml glycerol, 15 g agar, 750 ml air laut, dan 250 ml aquades) yang mengandung rifampisin 50 µg/ml (SWC+Rf). Koloni yang tumbuh pada media SWC+Rf merupakan mutan bakteri probiotik Rf<sup>R</sup>.

### Pertumbuhan Bakteri Probiotik Rf<sup>R</sup>

Bakteri probiotik tipe liar dan mutannya masing-masing ditumbuhkan pada media SWC-cair dalam shaker bergoyang pada suhu ruang. Konsentrasi setiap biakan diperoleh dengan mengukur kekeruhan suspensi biakan dengan metode turbidimetrik. Pengamatan dilakukan setiap jam selama 24 jam dan dibandingkan antara tipe liar dengan mutannya.

### Daya Hambat Bakteri Probiotik Rf<sup>R</sup> terhadap *V. harveyi* pada Larva Udang

Tiga isolat mutan bakteri probiotik Rf<sup>R</sup> diuji kembali efektivitasnya dalam menghambat pertumbuhan *V. harveyi* patogen pada larva udang. Pengujian dilakukan sama seperti tipe liarnya, namun selain terhadap kelangsungan hidup dan

pertumbuhan, pengamatan juga dilakukan terhadap populasi bakteri probiotik dan *V. harveyi* serta total bakteri, baik pada air pemeliharaan maupun larva udang. Pengamatan dilakukan menggunakan media TCBS+Rf untuk isolat *Vibrio* dan SWC+Rf untuk isolat non *Vibrio*. Pengujian dilakukan selama 12 hari, dengan kepadatan larva 10 ekor/l. Selama pengujian, udang diberi pakan berupa naupli *Artemia* dengan frekwensi pemberian pakan 5 kali sehari, yaitu setiap pukul 06.00, 10.00, 14.00, 18.00, dan 21.00.

### Identifikasi Isolat Probiotik terpilih

Untuk menentukan identitas isolat, dilakukan analisis sekuens gen 16S rRNA dengan metoda yang dikemukakan oleh Marchesi *et al.* (1998) dan telah dimodifikasi oleh Suwanto *et al.* (2002) yaitu meliputi ekstraksi DNA, amplikasi gen 16S-rRNA dengan PCR dan sekuensing dengan mesin sekuenser.

### Parameter yang Diamati

#### Tingkat Kelangsungan Hidup Larva Udang

Tingkat kelangsungan hidup larva udang dihitung dengan menggunakan rumus Effendie (1979):

$$SR = (Nt/No) \times 100 \%$$

Keterangan :

SR = Tingkat kelangsungan hidup (%)

Nt = Jumlah udang yang hidup pada akhir pengamatan (ekor)

No = Jumlah udang pada awal percobaan (ekor)

#### Pertumbuhan Larva Udang

Perubahan bobot dan panjang larva diamati pada awal dan akhir percobaan. Pertumbuhan larva udang windu dihitung berdasarkan pertambahan bobot dan panjang, dengan rumus Huisman (1987):

$$\alpha = \left\{ \left( \sqrt[t]{\frac{W_t}{W_o}} - 1 \right) \times 100\% \right\} \text{ dan}$$

$$\alpha = \left\{ \left( \sqrt[t]{\frac{L_t}{L_o}} - 1 \right) \times 100\% \right\}$$

Keterangan

$\alpha$  : Laju pertumbuhan harian udang (%)

t : Lama waktu pemeliharaan udang (hari)

Wt : Bobot rata-rata akhir udang (mg)

Wo : Bobot rata-rata awal udang (mg)

Lt : Panjang rata-rata akhir udang (mm)

Lo : Panjang rata-rata awal udang (mm)

### Populasi Bakteri

Populasi bakteri yang dihitung meliputi jumlah bakteri *V. harveyi*, bakteri probiotik dan total bakteri baik pada air pemeliharaan, udang hidup maupun udang mati. Pengamatan populasi bakteri pada air pemeliharaan dan larva udang hidup dilakukan setiap 2 hari sekali selama penelitian, sedangkan untuk pengamatan udang mati diamati setiap 6 jam sekali. Jumlah bakteri dihitung berdasarkan rata-rata jumlah koloni yang tumbuh dikalikan dengan faktor pengenceran.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

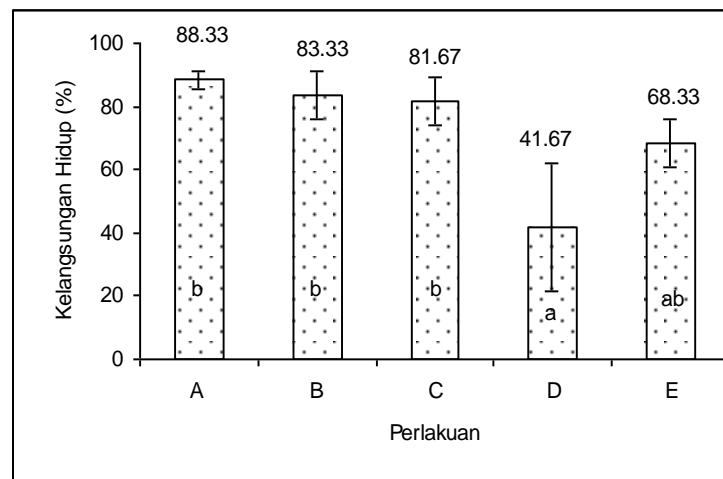
Ketiga isolat bakteri probiotik telah diuji efektivitasnya dalam meningkatkan kelangsungan hidup dan pertumbuhan larva udang windu. Hasil uji tersebut menunjukkan bahwa kelangsungan hidup larva yang selain ditambah *V. harveyi* juga diberi bakteri probiotik 1Ub, SKT-b dan Ua secara berturut-turut adalah 88,33%, 83,33%, dan 81,67%, sedangkan perlakuan kontrol positif (ditambah *V. harveyi* saja) sebesar 41,67% dan kontrol negatif (tanpa penambahan bakteri) sebesar 68,33% (Gambar 1). Peningkatan nilai kelangsungan hidup larva udang diduga karena adanya penghambatan pertumbuhan *V. harveyi* pada larva udang oleh bakteri probiotik. Isolat- isolat tersebut diduga juga dapat meningkatkan kebugaran larva udang. Hal ini terlihat dari nilai kelangsungan hidup larva pada kontrol negatif (tanpa penambahan bakteri probiotik maupun *V. harveyi*) lebih tinggi dibanding kontrol positif.

Untuk mengetahui pertumbuhan larva udang windu selama penelitian, maka dilakukan pengukuran panjang dan bobot larva pada awal dan akhir penelitian. Pada (Gambar 2) terlihat larva udang yang diberi

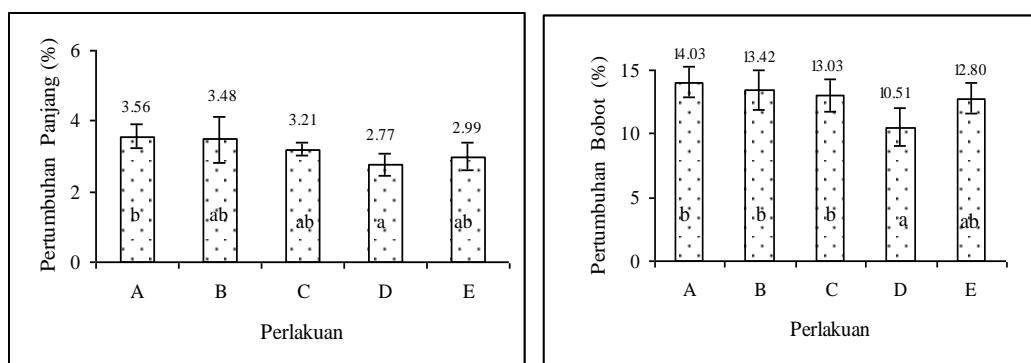
bakteri probiotik memiliki nilai pertumbuhan panjang lebih besar (3,21 – 3,56%) dibanding perlakuan tanpa probiotik (2,77 – 2,99%). Demikian pula untuk pertumbuhan bobot (Gambar 2) menunjukkan bahwa larva yang diberi probiotik menghasilkan pertumbuhan bobot lebih besar (13,03 – 14,03%) dibanding perlakuan tanpa pemberian probiotik (10,51 – 12,80%). Hal ini menunjukkan bahwa penambahan bakteri probiotik dapat meningkatkan pertumbuhan panjang dan bobot larva udang windu.

### Penggunaan Penanda $Rf^R$ pada Bakteri Probiotik

Dengan menumbuhkan kurang lebih  $10^8$  CFU/ml bakteri probiotik tipe liar sensitif rifampisin pada media SWC-agar yang mengandung rifampisin 50  $\mu$ g/ml, diperoleh mutan resisten rifampisin sebanyak 48 – 110 koloni. Morfologi koloni maupun pendarannya sama seperti tipe liarnya. Sebelum digunakan pada uji mekanisme penghambatan probiotik pada larva udang, maka mutan  $Rf^R$  yang telah diperoleh ini diuji pertumbuhannya dan dibandingkan dengan tipe liarnya.



Gambar 1. Kelangsungan hidup larva udang windu pada uji *in vivo* bakteri probiotik. A = 1Ub + MR 5339  $Rf^R$ , B = SKT-b + MR 5339  $Rf^R$ , C = Ua + MR 5339  $Rf^R$ , D = kontrol positif (MR 5339  $Rf^R$ ), dan E = Kontrol negatif (tanpa penambahan bakteri).



Gambar 2. Pertumbuhan panjang dan bobot larva udang windu pada uji *in vivo* bakteri probiotik. A = 1Ub + MR 5339  $Rf^R$ , B = SKT-b + MR 5339  $Rf^R$ , C = Ua + MR 5339  $Rf^R$ , D = Kontrol positif (MR 5339  $Rf^R$ ) dan E = kontrol negatif (tanpa penambahan bakteri).

### Pertumbuhan Bakteri Probiotik Rf<sup>R</sup>

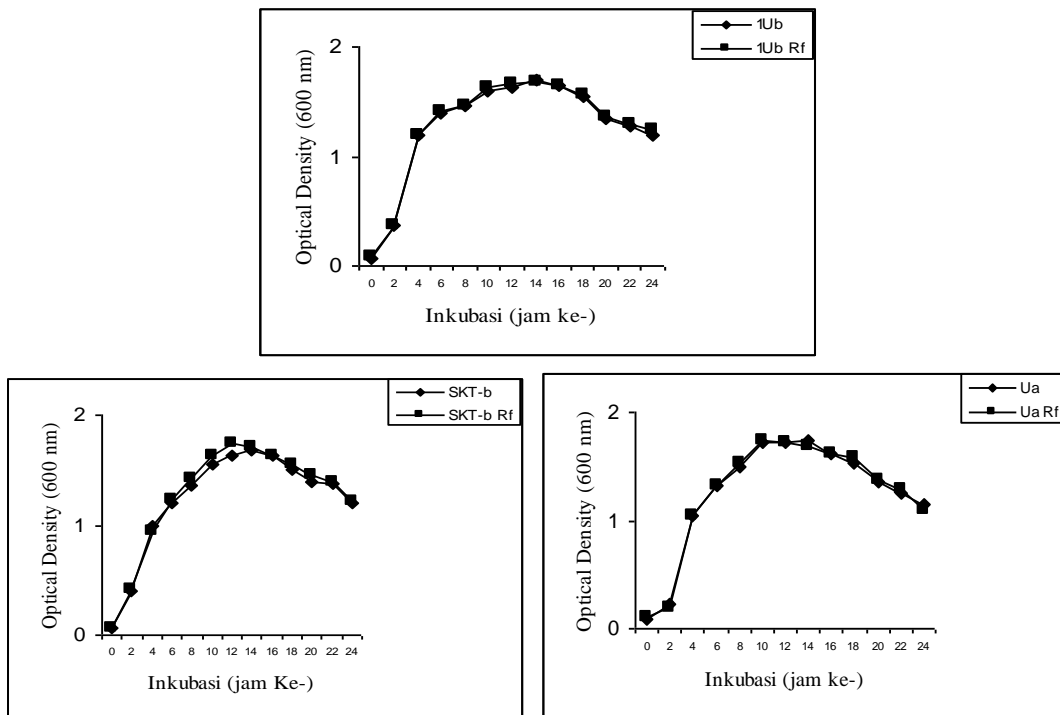
Hasil uji pertumbuhan bakteri probiotik baik tipe liar maupun yang diberi penanda resisten rifampisin (Rf<sup>R</sup>) dapat dilihat pada Gambar 3. Berdasarkan hasil tersebut dapat dilihat bahwa pertumbuhan 3 strain bakteri probiotik (1Ub, SKT-b, Ua) baik tipe liar maupun mutannya memiliki laju pertumbuhan yang relatif sama. Pertumbuhan tertinggi ketiga strain bakteri probiotik dicapai pada jam ke 10 – 14, dan akan menurun setelahnya. Hal ini menunjukkan adanya mutasi resisten rifampisin pada bakteri tersebut tidak berpengaruh terhadap pertumbuhannya. Dengan demikian penanda tersebut dapat digunakan sebagai penanda untuk memonitor keberadaan bakteri tersebut pada larva udang dan media pemeliharaan.

### Daya Hambat Bakteri Probiotik Rf<sup>R</sup> terhadap *V. harveyi* pada Larva Udang

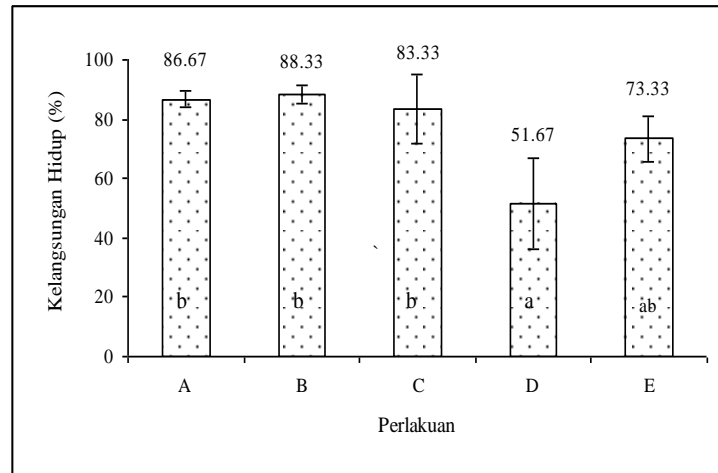
Tiga isolat mutan bakteri probiotik diuji efektivitasnya dalam menghambat serangan *V. harveyi* MR5339 Rf<sup>R</sup> pada larva udang windu. Pengamatan dilakukan terhadap kelangsungan hidup larva, pertumbuhan

panjang dan bobot larva serta populasi bakteri probiotik, *V. harveyi* MR5339 Rf<sup>R</sup> dan total bakteri baik pada air pemeliharaan, udang hidup maupun udang mati.

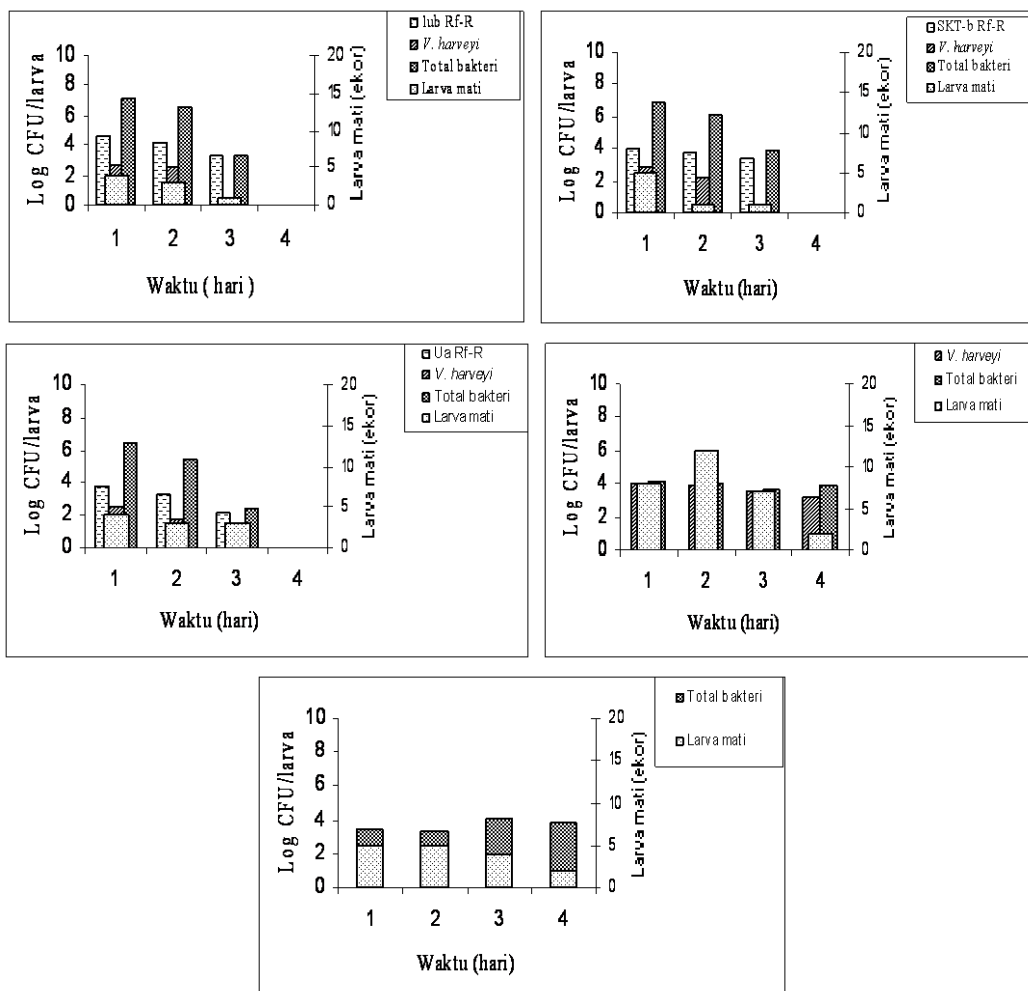
Hasil pengujian menunjukkan bahwa ketiga isolat mutan probiotik tersebut secara signifikan ( $p < 0,05$ ) dapat meningkatkan kelangsungan hidup larva udang (Gambar 4) seperti tipe liarnya. Kelangsungan hidup larva pada perlakuan dengan penambahan SKT-b, 1Ub, dan Ua berturut-turut adalah 88,33%, 86,67%, 83,33%, sedangkan perlakuan yang hanya diinokulasi dengan *V. harveyi* MR5339 Rf<sup>R</sup> tanpa probiotik, nilai kelangsungan hidupnya hanya mencapai 51,67%. Peningkatan nilai kelangsungan hidup larva udang terjadi karena adanya penghambatan pertumbuhan *V. harveyi* pada larva udang oleh bakteri probiotik. Hal ini ditunjukkan oleh lebih tingginya jumlah sel *V. harveyi* MR5339 Rf<sup>R</sup> pada perlakuan tanpa penambahan probiotik, dibanding pada perlakuan dengan penambahan probiotik, baik pada larva mati (Gambar 5), larva hidup (Gambar 6), maupun air media pemeliharaan (Gambar 7).



Gambar 3. Perbandingan pertumbuhan bakteri probiotik mutan dengan tipe liarnya



Gambar 4. Kelangsungan hidup larva udang pada uji daya hambat bakteri probiotik terhadap *V. harveyi*. A = 1Ub + MR 5339 Rf<sup>R</sup>, B = SKT-b + MR 5339 Rf, C = Ua+ MR 5339 Rf<sup>R</sup>, D = Kontrol positif (MR 5339 Rf<sup>R</sup>) dan E = kontrol negatif (tanpa penambahan bakteri).



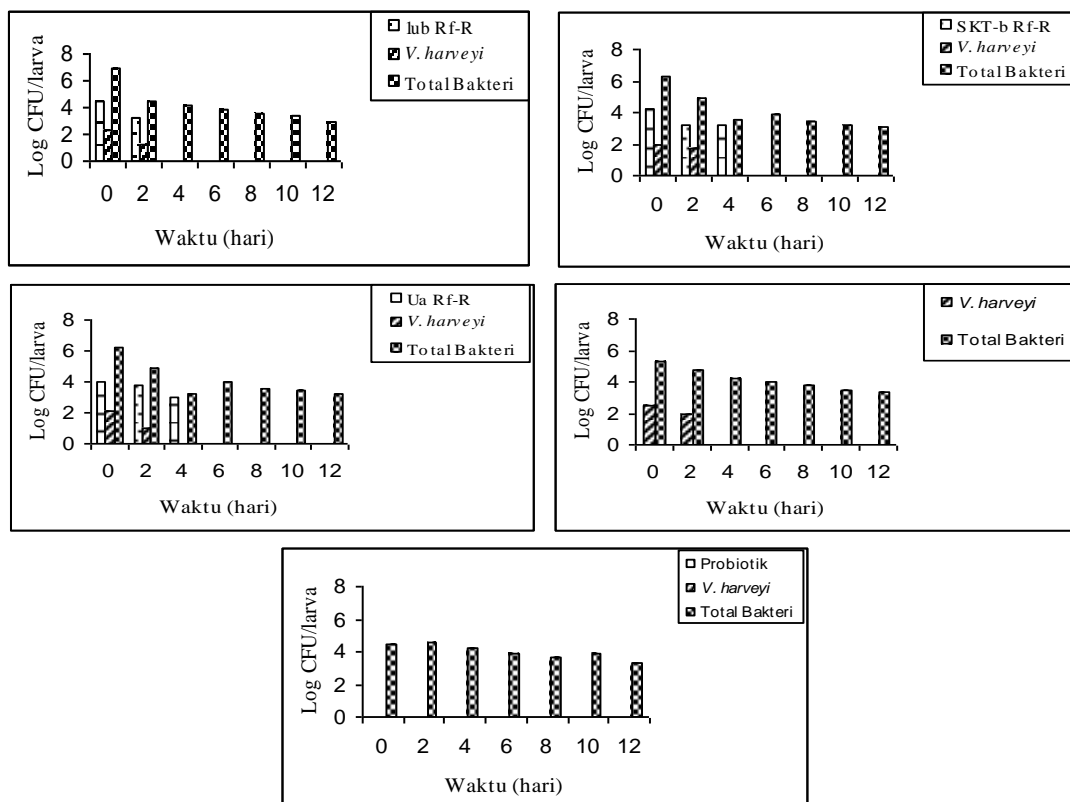
Gambar 5. Populasi bakteri probiotik, *V. harveyi*, dan total bakteri pada larva udang mati pada uji daya hambat bakteri probiotik terhadap *V. harveyi*.

Jumlah sel *V. harveyi* MR5339 Rf<sup>R</sup> pada larva mati (Gambar 5) berkisar antara  $10^2 - 10^4$  CFU/larva, diduga kisaran angka tersebut menunjukkan jumlah sel *V. harveyi* yang dapat menyebabkan kematian pada larva udang. Banyaknya jumlah larva yang mati setiap hari pada perlakuan tanpa penambahan probiotik juga menunjukkan adanya aktivitas penghambatan *V. harveyi* oleh bakteri probiotik.

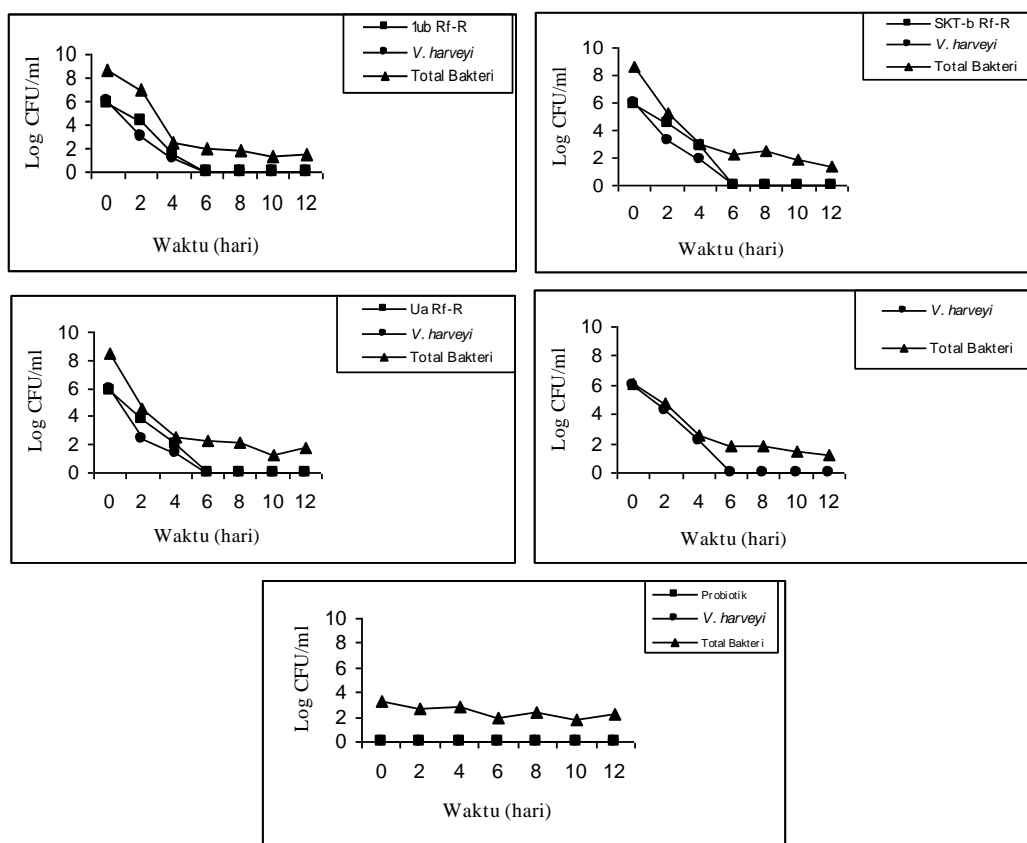
Pada Gambar 6 terlihat bahwa jumlah sel *V. harveyi* MR5339 Rf<sup>R</sup> pada larva hidup untuk perlakuan dengan penambahan probiotik berkisar  $10^1 - 10^2$  CFU/larva, dan sudah tidak terdeteksi lagi pada hari ke-4, sedangkan pada perlakuan tanpa probiotik jumlah sel *V. harveyi* berkisar antara  $10^2 - 10^3$  CFU/larva atau mendekati jumlah sel *V. harveyi* pada larva mati. Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan nilai kelangsungan hidup pada perlakuan dengan penambahan bakteri probiotik karena adanya kompetisi dari bakteri probiotik yang mencegah tercapainya jumlah (*quorum*) *V.*

*harveyi* yang dibutuhkan untuk mengekspresikan faktor-faktor virulensinya yang kemudian dapat membunuh larva udang.

Pada Gambar 7 terlihat penurunan jumlah sel *V. harveyi* MR5339 Rf<sup>R</sup> pada air pemeliharaan hingga  $10^2 - 10^4$  CFU/ml pada hari kedua, dan sudah tidak terdeteksi lagi pada hari ke-6. Adanya penghambatan bakteri probiotik menyebabkan jumlah sel *V. harveyi* MR5339 Rf<sup>R</sup> pada perlakuan dengan penambahan probiotik lebih rendah dibanding tanpa probiotik. Populasi total bakteri dari seluruh perlakuan memiliki pola yang sama, dimana populasinya mengalami penurunan hingga akhir penelitian. Dan populasi total bakteri tersebut mendekati total bakteri pada udang kontrol. Adanya penurunan ini diduga bersamaan dengan berkurangnya populasi bakteri probiotik maupun *V. harveyi* MR5339Rf<sup>R</sup> yang diinokulasikan sehingga populasi bakteri kembali mendekati populasi bakteri alaminya.



Gambar 6. Populasi bakteri probiotik, *V. harveyi*, dan total bakteri pada larva udang hidup pada uji daya hambat bakteri probiotik terhadap *V. harveyi*.



Gambar 7. Populasi bakteri probiotik, *V. harveyi*, dan total bakteri pada air pemeliharaan pada uji daya hambat bakteri probiotik terhadap *V. harveyi*.

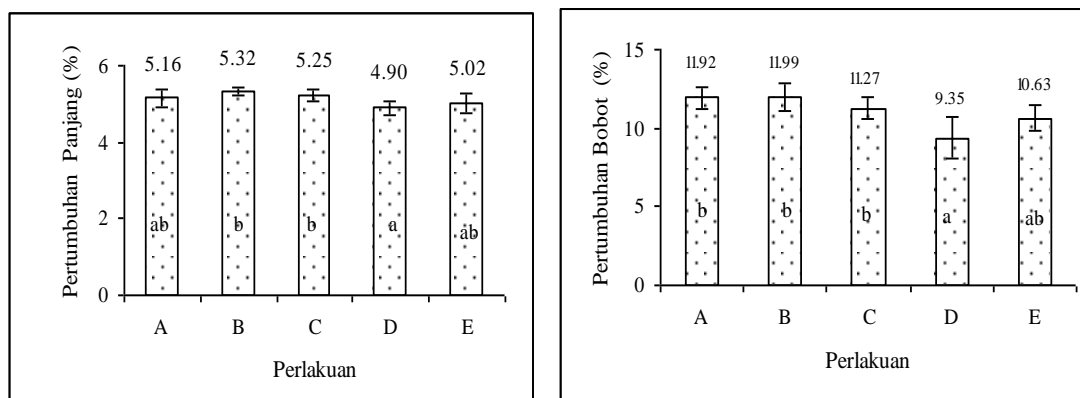
Pada Gambar 8 terlihat larva udang yang diberi probiotik memiliki nilai pertumbuhan panjang lebih besar (5,16 – 5,32%) dibanding perlakuan tanpa probiotik (4,90 – 5,02%). Demikian pula untuk pertumbuhan bobot (Gambar 8) menunjukkan bahwa larva yang diberi probiotik menghasilkan pertumbuhan bobot lebih besar (11,27 – 11,99 %) dibanding perlakuan tanpa pemberian probiotik (9,35 – 10,63%). Hal ini menunjukkan bahwa penambahan bakteri probiotik dapat meningkatkan pertumbuhan panjang dan bobot pada larva udang windu. Diduga pada perlakuan tanpa penambahan probiotik, larva udang menggunakan sebagian energi pertumbuhannya untuk mengatasi serangan *V. harveyi*, sehingga pertumbuhan panjang dan bobotnya lebih rendah dibanding perlakuan dengan penambahan bakteri probiotik. Pada perlakuan dengan penambahan probiotik, bakteri probiotik bekerja mengeliminir populasi *V. harveyi*,

sehingga larva udang dapat memanfaatkan energi yang tersedia lebih banyak untuk pertumbuhannya. Selain itu, bakteri probiotik yang diberikan kemungkinan mengandung makro dan mikro nutrien yang dibutuhkan larva udang dan dapat memberi kontribusi enzim untuk pencernaan yang menyebabkan udang dapat mencerna pakan lebih baik, sehingga nutrisi yang diserap oleh tubuh udang juga lebih banyak, yang akhirnya akan memberikan pertumbuhan yang baik.

### Identifikasi Bakteri Probiotik

Hasil analisis sekuen sebagian gen 16-rRNA menunjukkan bahwa isolat 1Ub termasuk spesies *Pseudoalteromonas piscicida* dengan indeks kemiripan 98%, SKT-b termasuk spesies *Vibrio alginolyticus* dengan indeks kemiripan 88%, dan Ua termasuk spesies *Vibrio alginolyticus* dengan indeks kemiripan 98%.





Gambar 8. Pertumbuhan panjang dan bobot larva udang pada uji daya hambat bakteri probiotik terhadap *V. harveyi*. A = 1Ub + MR 5339 Rf<sup>R</sup>, B = SKT-b + MR 5339 Rf, C = Ua + MR 5339 Rf<sup>R</sup>, D = Kontrol positif (MR 5339 Rf<sup>R</sup>) dan E = kontrol negatif (tanpa penambahan bakteri).

## KESIMPULAN

Isolat probiotik 1Ub, SKT-b, dan Ua efektif menghambat pertumbuhan *V. harveyi* serta secara signifikan dapat meningkatkan kelangsungan hidup larva udang windu. Peningkatan kelangsungan larva udang tersebut terjadi karena adanya penghambatan pertumbuhan *V. harveyi* oleh bakteri probiotik yang kemungkinan melalui kompetisi tempat pelekatan atau sumber nutrisi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Effendie M.I. 1979. Metode biologi perikanan. Yayasan Dewi Sri. Bogor. 105 hal.
- Hala Y, Suwanto A, Affandi R, dan Zairin MZ. 2002. Adherence and pathogenicity assay of *Vibrio harveyi* in tiger shrimp (*Penaeus monodon*) larvae for screening biocontrol agent. *Biotropia*, 18:8-51.
- Haryanti, Sugama K, Tsamura S, dan Nishijims T. 2000. Vibriostatic bacterium isolated from seawater: Potentiality as probiotics agent in the rearing of *Penaeus monodon* larvae. *Ind. Fish. Res. J.*, 6:26-32.
- Huisman E.A. 1987. Principles of fish production. Department of Fish Culture and Fisheries. Wageningen Agricultural University. Netherlands. 170p.
- Marchesi J.R *et al.* 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16 rRNA. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 64:795-799.
- Muliani. 2003. Isolasi dan karakterisasi bakteri asal laut Sulawesi untuk biokontrol penyakit vibriosis pada larva udang windu *Penaeus monodon*. Tesis. Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Proksch, P. 2000. Bioactive natural products from marine invertebrates and associated microorganisms. *Proc. Int. Symposium on Marine Biotechnology*. Jakarta.
- Rajab, F. 2006. Isolasi dan seleksi bakteri probiotik dari lingkungan tambak dan hatchery untuk pengendalian penyakit Vibriosis pada larva udang windu (*Penaeus monodon*).
- Suryati E, Parenrengi A, dan Muliani. 2004. Analisis toksisitas dan penanggulangan penyakit udang windu

- Penaeus monodon* Fabricus menggunakan bioaktif sponge. Prosiding Pengendalian Penyakit pada ikan dan udang berbasis imunisasi dan biosecurity, Purwokerto, 18-19 Mei 2004.
- Suwanto A, Yogiara, Suyanto D, Tan I, dan Puspitasari E. 2002. Compilation of practical manual. Biotrop Training Course in Microbial Biodiversity.
- Tjahjadi M.R, Angka S.L, dan 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.
- Tepu, I. 2006. Seleksi bakteri probiotik untuk biokontrol vibriosis pada larva udang windu (*Penaeus monodon*) menggunakan cara kultur bersama. Skripsi. Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB.
- Widanarni, Suwanto A, Sukenda, dan Lay BW. 2003. Potency of *Vibrio* isolates for biocontrol of vibriosis in tiger shrimp (*Penaeus monodon*) larvae. Biotropia, 20:11-23.