

**KAJIAN BAKTERI PROBIOTIK LOKAL UNTUK  
MENINGKATKAN STATUS KESEHATAN UDANG VANNAMEI**

***Litopenaeus vannamei* (Boone)**

**TUBAGUS HAERU RAHAYU**

**0606037443**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**

**PROGRAM PASCASARJANA**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI**

**DEPOK**

**2009**

**KAJIAN BAKTERI PROBIOTIK LOKAL UNTUK  
MENINGKATKAN STATUS KESEHATAN UDANG VANNAMEI**

*Litopenaeus vannamei* (Boone)

**DISERTASI**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk  
memperoleh gelar Doktor Sains**

**Oleh:**

**TUBAGUS HAERU RAHAYU**

**0606037443**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**

**PROGRAM PASCASARJANA**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI**

**DEPOK**

**2009**



**JUDUL** : KAJIAN BAKTERI PROBIOTIK LOKAL UNTUK  
MENINGKATKAN STATUS KESEHATAN UDANG  
VANNAMEI, *Litopenaeus vannamei* (Boone)

**NAMA** : TUBAGUS HAERU RAHAYU

**NPM** : 0606037443

**MENYETUJUI:**



**Wellyzar Sjamsuridzal, Ph.D.**  
Promotor



**Dr. Ir. Ety Riani, M.S.**  
Ko-Promotor



**Dr. Ir. Iin Siti Djunaidah, M.Sc.**  
Ko-Promotor



**Prof. Dr. drh. Fachriyan H. Pasaribu**  
Penguji



**Dr. Marthen B.M. Malole**  
Penguji



**Prof. (Emeritus) Dr. Indrawati Gandjar**  
Penguji

**Ketua Program Studi Pascasarjana  
Biologi**



**Dr. Luthfirda Sjahfirdi, M.Biomed.**

**Ketua Program Pascasarjana  
FMIPA - UI**



**Dr. Adi Basukriadi, M.Sc.**

**Tanggal:**

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT, atas rahmat dan karuniaNya, penelitian dan penulisan disertasi dengan judul "Kajian bakteri probiotik lokal untuk meningkatkan status kesehatan udang vannamei *Litopenaeus vannamei* (Boone)" berhasil diselesaikan. Disertasi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Doktor pada Program Pascasarjana, Program Studi Biologi di FMIPA - UI.

Disertasi ini terdiri dari empat tulisan yaitu: (1) Isolasi bakteri dan seleksi kandidat probiotik lokal terhadap kelangsungan hidup udang vannamei, *Litopenaeus vannamei* (Boone), (2) seleksi bakteri probiotik lokal berdasarkan kemampuan terapi pada udang vannamei, *Litopenaeus vannamei*, (Boone) yang terinfeksi *white spot syndrome virus* (WSSV), (3) uji efikasi bakteri probiotik lokal terhadap persentase penetasan kista *Artemia salina* (Leach), dan (4) Identifikasi dan analisis filogenetik bakteri probiotik lokal untuk udang vannamei, *Litopenaeus vannamei* (Boone) berdasarkan data *sequence* gen 16S *ribosomal* RNA.

Melalui kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada Ibu Wellyzar Sjamsuridzal, Ph.D., sebagai promotor; Ibu Dr. Ir. Ety Riani, M.S., dan Ibu Dr. Ir. Iin Siti Djunaidah, M.Sc. sebagai ko-promotor yang telah memberikan saran dan arahan sehingga hasil penelitian ini tersusun menjadi disertasi. Terima kasih pula disampaikan kepada Prof. (Emeritus) Dr. Indrawati Gandjar yang telah memberikan saran, dan bimbingan selama

menempuh studi. Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Ketua Sekolah Tinggi Perikanan (STP) Jakarta yang memberikan ijin kepada penulis untuk mengikuti studi program doktor. Terima kasih disampaikan kepada Ketua Program Studi Pascasarjana, Program Studi Biologi yang telah menerima penulis mengikuti pendidikan pascasarjana di UI. Terima kasih disampaikan kepada Kepala Pusat Pendidikan Kelautan dan Perikanan, DKP yang telah memberikan beasiswa pendidikan di UI.

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Kepala Pusat Riset Perikanan Budidaya, Kepala Laboratorium Kesehatan Ikan, STP Jakarta, Kepala Laboratorium Mikrobiologi dan Kepala Laboratorium Genetika, Departemen Biologi UI, serta Ketua *Center of Excellence Indigenous Biological Resources-Genome Studies (CoE IBR-GS)* UI yang telah membantu selama penelitian. Secara khusus penulis mengucapkan terima kasih kepada isteri, anakku tercinta dan keluarga yang telah memberikan doa dan restu sehingga penyusunan disertasi ini dapat diwujudkan.

Penulis menyadari bahwa tulisan ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu saran dan kritik yang bersifat membangun sangat diharapkan. Akhirnya, semoga tulisan ini bermanfaat buat para pembaca.

Depok, 19 Mei 2009

Penulis

**Nama** : Tubagus Haeru Rahayu (0606037443)  
**Judul** : KAJIAN BAKTERI PROBIOTIK LOKAL UNTUK  
MENINGKATKAN STATUS KESEHATAN UDANG  
VANNAMEI, *Litopenaeus vannamei* (Boone)  
**Promotor** : Wellyzar Sjamsuridzal, Ph.D.  
**Ko-Promotor** : Dr. Ir. Ety Riani, M.S.; Dr. Ir. lin Siti Djunaidah, M.Sc.

---

## SUMMARY

Shrimp cultivation in ponds, especially *Penaeus monodon* Fabricius in Indonesia is depressed by disease, particularly due to white spot syndrome virus (WSSV). Antibiotics, which have been used in large quantities in aquaculture are often cause for concern in promoting transfer of antibiotic resistance to human pathogens. Many scientists reported that the application of probiotic bacteria provides a promising solution to these problems. Probiotic is now developed and used for shrimp culture in several countries such as: Thailand, China, Philippines, India, and Taiwan to increase the production target.

The aim of this study was to find indigenous probiotic bacteria which can be used as therapeutic agent for vannamei shrimp (*Litopenaeus vannamei*) (Boone) toward WSSV. To achieve the aim above, a number of experiments were conducted, *i.e.* 1) isolation and selection of indigenous probiotic bacteria based on shrimp's survival rate, 2) selection of probiotic bacteria based on their ability to cure vannamei shrimp infected by WSSV, 3) efficacy test of probiotic

bacteria on the hatching rate of the cysts of *Artemia salina*, and 4) identification of selected isolates based on sequence of 16S ribosomal RNA gene.

The hypotheses of this studies were as follows: (a) indigenous probiotic bacteria can be isolated from several locations of shrimp farming (b) indigenous probiotic bacteria can be used as therapeutic agent for shrimp towards WSSV, (c) indigenous probiotic bacteria show no negative effect towards other trophic level in aquaculture *i.e.* *A. salina*, and (d) selected probiotic bacteria can be identified based on 16S ribosomal RNA gene sequence analysis.

The bacterial isolates were sampled randomly from 5 to 7 stations on each shrimp pond and 5 to 7 ponds on each sampling sites. Bacterial isolates were taken from four sites *i.e.* Pandeglang, Serang, Tangerang and Karawang during January 2007, and obtained from various substrates (water, sediments and shrimp's guts). Samples were diluted and enriched using triptic soy broth (TSB) before streaked on Marine Agar. All bacterial isolates were screened to find out the effect on shrimp's survival rate with bacterial concentration of  $10^6 \text{.ml}^{-1}$  for 21 days using post larvae (PL<sub>10</sub>) of *Litopenaeus vannamei*. The selected bacterial isolates from first step were examined for their ability to cure vannamei shrimp infected by white spot syndrome virus (WSSV). Sixteen specific pathogenic free (SPF) juveniles of vannamei shrimps in each container were previously immersed in a  $10^{-5}$  diluted WSSV stock medium for three hours and transferred to the water cultures containing  $10^6 \text{.ml}^{-1}$  of putative probiotic bacterial isolate for 21 days. The parameters examined were: the shrimp survival rate, the shrimp immunity indexes, the gills and hepatopancreas

shrimp's histopathology, and the existence of WSSV in shrimp. In the third experiment, the selected bacterial isolates from the second experiment were further studied to find out their effect on the hatching percentage of *A. salina* cysts, and followed by identification of bacterial isolates based on 16S ribosomal RNA gene sequence analysis.

One hundred sixty eight bacterial isolates from pond water, sediment, and shrimp's gut were obtained from Pandeglang, Serang, Tangerang and Karawang, which are located in the northern west coasts of Java Island. Based on the morphotype selection, a total of 136 bacterial isolates were selected for screening to obtain potential probiotic bacteria based on shrimp's survival rate. As a result, seventy one isolates caused better shrimp survival rate (80.33% to 98.89%) compared to the control (no addition of putative probiotic bacteria to shrimps) which was only 80.23%.

Selection of bacterial isolates as therapeutic agent for shrimps infected by WSSV were based on the ability of the isolate to cure vannamei shrimps infected by WSSV with four parameters *i.e.* shrimp's survival rate, shrimp's immunity indexes, gill and hepatopancreas shrimp's histopathology and existence of WSSV on shrimps after treatment. As a result, nineteen out of 71 isolates showed the ability to increase the survival rate of shrimps from 25% to 58.3% compared to the control which was only 8.3%; the shrimp's phagocytic activity increased from 17.7% to 30% compared to the control 11%; the total shrimp's haemocytes increased from 18.000 to 29.000 cell per  $\text{mm}^3$  compared to the control 11.300 cell per  $\text{mm}^3$ ; gills and hepatopancreas histopathological

performances of the shrimps were better and no detection of WSSV in vannamei shrimps compared to the control.

The efficacy test of the selected probiotic bacteria to other tropic level organisms (*i.e. A. salina*) showed that 19 selected isolates indicated no negative effect on the hatching percentage of *A. salina* cysts and those isolates were able to suppress the pathogenic *Vibrio* sp. in hatching water of *A. salina*.

Identification results of the 19 selected isolates based on 16S ribosomal RNA gene sequences showed that all isolates belong to Gram positif bacteria and they consist of *Bacillus subtilis* (1), *Bacillus pumilus* (5), *Bacillus megaterium* (1), *Bacillus flexus* (3), *Bacillus* sp. (7), *Micrococcus* sp. (1) and *Micrococcus luteus* (1). Phylogenetic analysis using the *neighbour-joining* method with two Kimura parameters showed that 19 isolates were clustered into two groups *i.e. Bacillus* group (17 isolates) and *Micrococcus* group (2 isolates).

This study showed that the selected 19 indigenous probiotic bacteria can be used as a therapeutic agent for vannamei shrimps infected by WSSV in Indonesia.

xvi + 255pp.; 12 tables.; 33 plates.; 40 appendixes.  
Bibl.: 71 (1958-2008)

## DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR.....	i
SUMMARY.....	iii
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
PENGANTAR PARIPURNA.....	1
<b>MAKALAH I:</b>	
<b>ISOLASI DAN SELEKSI KANDIDAT BAKTERI PROBIOTIK LOKAL TERHADAP KELANGSUNGAN HIDUP UDANG VANNAMEI, <i>Litopenaeus vannamei</i> (Boone).....</b>	<b>33</b>
<i>Abstract</i> .....	33
Pendahuluan.....	34
Bahan dan metode.....	36
Hasil dan pembahasan.....	45
Kesimpulan.....	61
Daftar acuan.....	62
Lampiran.....	66



## MAKALAH II:

SELEKSI BAKTERI PROBIOTIK LOKAL BERDASARKAN KEMAMPUAN TERAPI PADA UDANG VANNAMEI, <i>Litopenaeus vannamei</i> (Boone) YANG TERINFEKSI <i>WHITE SPOT SYNDROME VIRUS</i> (WSSV).....	85
<i>Abstract</i> .....	85
Pendahuluan.....	86
Bahan dan metode.....	105
Hasil dan pembahasan.....	117
Kesimpulan.....	143
Daftar acuan.....	144
Lampiran.....	151

## MAKALAH III

UJI EFIKASI BAKTERI PROBIOTIK LOKAL TERHADAP PERSENTASE PENETASAN KISTA <i>Artemia salina</i> (Leach) .....	155
<i>Abstract</i> .....	155
Pendahuluan.....	156
Bahan dan metode.....	160
Hasil dan pembahasan.....	166
Kesimpulan.....	174
Daftar acuan.....	174
Lampiran.....	178

**MAKALAH IV:**

<b>IDENTIFIKASI DAN ANALISIS FILOGENETIK BAKTERI PROBIOTIK LOKAL UNTUK UDANG VANNAMEI, <i>Litopenaeus vannamei</i> (Boone) BERDASARKAN DATA SEQUENCE GEN 16S RIBOSOMAL RNA.....</b>	<b>180</b>
<i>Abstract</i> .....	180
Pendahuluan.....	181
Bahan dan metode.....	184
Hasil dan pembahasan.....	190
Kesimpulan.....	211
Daftar acuan.....	212
Lampiran.....	215
<b>DISKUSI PARIPURNA.....</b>	<b>238</b>
<b>KESIMPULAN UMUM DAN REKOMENDASI.....</b>	<b>247</b>
<b>DAFTAR ACUAN.....</b>	<b>249</b>

## DAFTAR TABEL

		Halaman
<b>MAKALAH I</b>		
Tabel I.1	Isolat bakteri yang diperoleh dari empat daerah sampling.....	45
Tabel I.2	Hasil seleksi berdasarkan <i>morphotype</i> isolat bakteri dari empat daerah sampling.....	48
Tabel I.3	Sebaran kandidat bakteri probiotik pada pH 2,0.....	49
Tabel I.4	Jumlah kandidat isolat bakteri probiotik lokal hasil seleksi berdasarkan kelangsungan hidup udang vannamei.....	54
<b>MAKALAH III</b>		
Tabel III.1	Hasil pengukuran kualitas air media penetasan kista <i>Artemia salina</i> .....	173
<b>MAKALAH IV</b>		
Tabel IV.1	Isolat-isolat bakteri yang diidentifikasi berdasarkan data <i>sequence</i> gen 16S rRNA.....	185
Tabel IV.2	Identitas isolat bakteri probiotik terpilih untuk udang vannamei berdasarkan data <i>sequence</i> gen 16S rRNA...	193
Tabel IV.3	Distribusi spesies bakteri probiotik terpilih untuk udang vannamei pada lokasi sampling.....	195
Tabel IV.4	Distribusi spesies bakteri probiotik terpilih untuk udang vannamei terhadap sebaran substrat yang diperoleh.....	197
Tabel IV.5	Jenis bakteri dan nomor akses dari <i>sequence</i> gen 16S rRNA dari GenBank yang digunakan dalam pembuatan pohon filogenetik .....	200
Tabel IV.6	Karakter yang dimiliki beberapa bakteri genus <i>Bacillus</i> .....	204
Tabel IV.7	Hasil pengamatan morfologi makroskopik isolat bakteri probiotik terpilih yg diinkubasi 48 jam pada suhu 30° C.	210

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
<b>PENGANTAR PARIPURNA</b>	
Gambar 1	Udang vannamei..... 3
Gambar 2	Siklus hidup udang vannamei..... 4
Gambar 3	Produksi udang Asia dan beberapa penyakit penting..... 8
Gambar 4	Penyebaran dan distribusi penyakit WSSV..... 10
Gambar 5	Penampakan udang yang terkena serangan WSSV..... 11
Gambar 6	Skema aplikasi probiotik pada pembudidayaan udang dikaitkan dengan tiga faktor yang mempengaruhi dalam mekanisme terjadinya penyakit secara alamiah..... 16
Gambar 7	Siklus hidup <i>Artemia</i> ..... 25
Gambar 8	Skema kerangka permasalahan dalam budidaya udang vannamei di tambak, kondisi saat ini dan yang diharapkan. 30
<b>MAKALAH I</b>	
Gambar I.1	Kelangsungan hidup udang vannamei pada volume wadah pemeliharaan yang berbeda..... 51
Gambar I.2	Mortalitas udang vannamei setelah dipapar pada konsentrasi <i>Vibrio harveyi</i> berbeda..... 53
Gambar I.3	Kelangsungan hidup udang vannamei setelah di paparkan kandidat bakteri probiotik dari 4 daerah sampling ..... 56
<b>MAKALAH II</b>	
Gambar II.1	Morfologi pewarnaan negatif virion WSSV pada mikroskop elektron yang dipurifikasi dengan sentrifugasi gradient sukrosa..... 87

Gambar II.2	Genom WSSV berukuran 305.107 pb., tanda panah menunjukkan 181 <i>open reading frame</i> (ORF), segitiga menunjukkan 9 <i>homolog region</i> (hrs).....	88
Gambar II.3	Diagram dari <i>SalI</i> -1461 pb fragmen DNA klon dalam plasmid <i>psm</i> 146.....	90
Gambar II.4	Skema model kerja dari probiotik saat terjadinya serangan penyakit.....	97
Gambar II.5	Sel darah udang normal tanpa fagositosis. H: sel <i>hyalin</i> , S: sel semigranular, L: sel granular .....	99
Gambar II.6	Gambaran perkembangan sel darah udang dan model reaksi terhadap gangguan dari luar (stres/penyakit).....	100
Gambar II.7	Gambaran secara skematis proses fagositosis pada organisme dengan sistem kekebalan non spesifik .....	102
Gambar II.8	Skema mekanisme pertahanan selular dalam hemosit udang. ....	104
Gambar II.9	Pengambilan <i>haemolymph</i> udang vannamei dari bagian <i>ventral</i> pada segmen kedua badan udang.....	113
Gambar II.10	Hasil elektroforesis produk PCR sampel udang bahan inokulum WSSV yang diambil dari kaki renang udang. ....	118
Gambar II.11	Hasil elektroforesis produk PCR sampel udang hari ke 14 berdasarkan pengenceran berseri stok WSSV.....	119
Gambar II.12	Persentase kelangsungan hidup udang vannamei dari isolat bakteri lokal potensial hasil seleksi setelah diuji terhadap WSSV. ....	123
Gambar II.13	Persentase aktivitas fagositosis udang vannamei dari isolat bakteri lokal potensial hasil seleksi setelah diuji terhadap WSSV selama 21 hari. ....	126
Gambar II.14	Total hemosit udang vannamei dari isolat bakteri lokal potensial hasil seleksi setelah diuji terhadap WSSV selama 21 hari.....	127
Gambar II.15	Contoh visualisasi aktivitas fagositosis udang oleh sel <i>hyalin</i> dari sampel T <sub>26</sub> . ....	130

Gambar II.16	Histopatologi insang udang vannamei dengan pewarnaan H&E (potongan longitudinal). .....	133
Gambar II.17	Histopatologi hepatopankreas udang vannamei dengan pewarnaan H&E (potongan melintang). .....	135
Gambar II.18	Visualisasi bercak putih pada udang yang terinfeksi WSSV	140
Gambar II.19	Hasil elektroforesis produk PCR sampel udang vannamei yang diinfeksi WSSV.....	141
<b>MAKALAH III</b>		
Gambar III.1	Persentase penetasan kista <i>A. salina</i> setelah 24 jam masa inkubasi.....	167
<b>MAKALAH IV</b>		
Gambar IV.1	Visualisasi produk PCR gen 16S rRNA dari isolat-isolat bakteri terpilih menggunakan primer 9F dan 1510R .....	191
Gambar IV.2	Posisi filogenetik 19 isolat bakteri probiotik terpilih dalam genera <i>Bacillus</i> dan <i>Micrococcus</i> pada kelompok bakteri Gram positif berdasarkan data <i>sequence</i> gen 16S rRNA...	201

## DAFTAR LAMPIRAN

		Halaman
<b>MAKALAH I</b>		
Lampiran 1.1	Isolat bakteri hasil isolasi awal yang diperoleh dari daerah Serang-Banten.....	66
Lampiran 1.2	Isolat bakteri hasil isolasi awal yang diperoleh dari daerah Tangerang-Banten.....	67
Lampiran 1.3	Isolat bakteri hasil isolasi awal yang diperoleh dari daerah Karawang-Jawa Barat.....	69
Lampiran 1.4	Isolat bakteri hasil isolasi awal yang diperoleh dari daerah Pandeglang-Banten.....	71
Lampiran 1.5	Isolat hasil seleksi yang diperoleh dari daerah Serang-Banten.....	72
Lampiran 1.6	Isolat hasil seleksi yang diperoleh dari daerah Tangerang-Banten.....	73
Lampiran 1.7	Isolat hasil seleksi yang diperoleh dari daerah Karawang-Jawa Barat.....	74
Lampiran 1.8	Isolat hasil seleksi yang diperoleh dari daerah Pandeglang-Banten.....	75
Lampiran 1.9	Hasil pengujian statistik evaluasi wadah (toples) yang digunakan selama percobaan.....	76
Lampiran 1.10	Hasil pengujian statistik penentuan konsentrasi bakteri <i>Vibrio harveyi</i> .....	77
Lampiran 1.11	Hasil pengujian statistik kelangsungan hidup udang vannamei dari daerah Serang.....	78
Lampiran 1.12	Hasil pengujian statistik kelangsungan hidup udang vannamei daerah Tangerang.....	78
Lampiran 1.13	Hasil pengujian statistik kelangsungan hidup udang vannamei daerah Karawang.....	81

Lampiran 1.14	Hasil pengujian statistik kelangsungan hidup udang vannamei daerah Pandeglang.....	83
<b>MAKALAH II</b>		
Lampiran II.1	Data kelangsungan hidup udang vannamei.....	151
Lampiran II.2	Hasil perhitungan statistik efikasi kandidat probiotik lokal terhadap <i>white spot syndrome virus</i> (WSSV).....	152
Lampiran II.3.	Data aktivitas fagosit udang vannamei.....	153
Lampiran II.4	Data total hemosit udang vannamei.....	154
<b>MAKALAH III</b>		
Lampiran III.1	Hasil perhitungan statistik evaluasi efikasi probiotik bakteri lokal terhadap kualitas penetasan kista <i>Artemia</i> .....	178
Lampiran III.1	Data persentase penetasan kista <i>Artemia</i> setelah 24 jam inkubasi.....	179
<b>MAKALAH IV</b>		
Lampiran IV.1	Hasil BLAST data <i>sequence</i> gen 16S rRNA, isolat P10.....	215
Lampiran IV.2	Hasil BLAST data <i>sequence</i> gen 16S rRNA, isolat P16.....	216
Lampiran IV.3	Hasil BLAST data <i>sequence</i> gen 16S rRNA, isolat K48.....	217
Lampiran IV.4	Hasil BLAST data <i>sequence</i> gen 16S rRNA, isolat P43.....	218
Lampiran IV.5	Hasil BLAST data <i>sequence</i> gen 16S rRNA, isolat P18.....	219
Lampiran IV.6	Hasil BLAST data <i>sequence</i> gen 16S rRNA, isolat S18.....	220



Lampiran IV.7	Hasil BLAST data <i>sequence</i> gen 16S rRNA, isolat T17.....	221
Lampiran IV.8	Hasil BLAST data <i>sequence</i> gen 16S rRNA, isolat T28.....	222
Lampiran IV.9	Hasil BLAST data <i>sequence</i> gen 16S rRNA, isolat T1.....	223
Lampiran IV.10	Hasil BLAST data <i>sequence</i> gen 16S rRNA, isolat P11.....	224
Lampiran IV.11	Hasil BLAST data <i>sequence</i> gen 16S rRNA, isolat S23.....	225
Lampiran IV.12	Hasil BLAST data <i>sequence</i> gen 16S rRNA, isolat T18.....	225
Lampiran IV.13	Hasil BLAST data <i>sequence</i> gen 16S rRNA, isolat K52.....	227
Lampiran IV.14	Hasil BLAST data <i>sequence</i> gen 16S rRNA, isolat P7.....	228
Lampiran IV.15	Hasil BLAST data <i>sequence</i> gen 16S rRNA, isolat T21.....	229
Lampiran IV.16	Hasil BLAST data <i>sequence</i> gen 16S rRNA, isolat T26.....	230
Lampiran IV.17	Hasil BLAST data <i>sequence</i> gen 16S rRNA, isolat T9.....	231
Lampiran IV.18	Hasil BLAST data <i>sequence</i> gen 16S rRNA, isolat S9.....	232
Lampiran IV.19	Hasil BLAST data <i>sequence</i> gen 16S rRNA, isolat T23.....	233
Lampiran IV.20	Data hasil <i>sequence</i> gen 16S rDNA dari 19 isolat bakteri lokal terpilih.....	234



## PENGANTAR PARIPURNA

### LATAR BELAKANG

Udang merupakan salah satu komoditas unggulan bagi sektor perikanan dan merupakan sumber devisa negara. Produksi pada tahun 2007 mencapai 318.565 MT dengan nilai sekitar 2,5 milyar dolar AS atau 30% dari total devisa sektor perikanan (Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya 2008). Kontribusi devisa tersebut didominasi oleh hasil budidaya udang penaeid, terutama udang Windu (*Penaeus monodon* Fabricius). Namun kegiatan budidaya udang seringkali mengalami kegagalan akibat serangan penyakit, terutama disebabkan oleh *white spot syndrome virus* (WSSV).

Sebagai alternatif pengganti udang windu, upaya yang dilakukan adalah memelihara udang introduksi, yaitu udang vannamei *Litopenaeus vannamei* (Boone). Udang tersebut merupakan komoditas pengganti udang windu yang diharapkan mampu mengembalikan produksi udang. Udang vannamei pertama kali diintroduksi ke Indonesia tahun 2001, melalui SK Menteri Kelautan dan Perikanan No. 41 tahun 2001. Pemerintah menetapkan udang vannamei sebagai varietas unggul pada tanggal 12 Juli 2002 (Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya 2004). Akan tetapi ternyata udang vannamei juga rentan terhadap serangan WSSV.

Salah satu strategi pengendalian penyakit akuakultur yang diterapkan saat ini adalah aplikasi probiotik, yaitu penambahan mikroorganisme yang menguntungkan bagi inangnya. Probiotik, saat ini tidak hanya digunakan

sebagai agen pencegahan (*prophylactic*) namun juga sebagai agen pengobatan (*therapeutic*) (Cunningham-Rundles dkk. 2000; Marteau dkk. 2001; Isolauri dkk. 2002; Lisal 2005). Penerapan probiotik dalam akuakultur terbukti mampu meningkatkan resistensi udang, ikan dan biota akuakultur lainnya terhadap serangan infeksi (Rengpipet dkk. 2000; Verschueren 2000).

## UDANG VANNAMEI

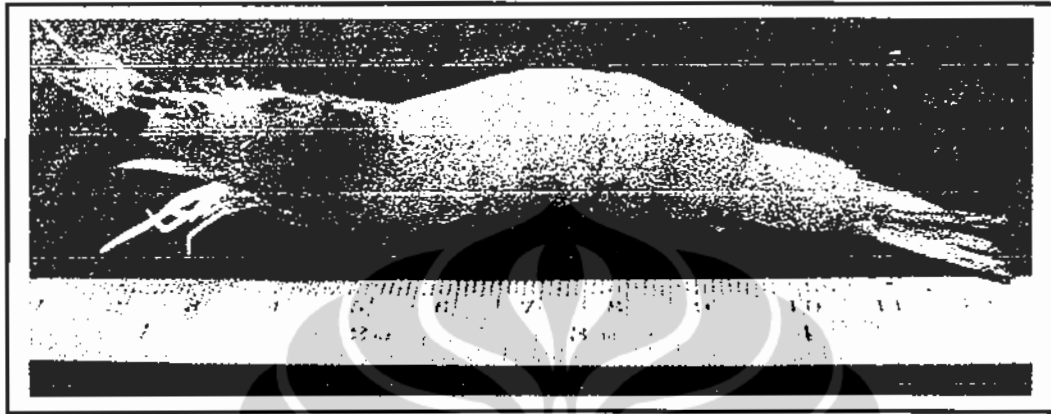
### Taksonomi

Udang vannamei (Gambar 1) digolongkan ke dalam sub filum *Crustacea*. Ciri-ciri sub filum *Crustacea*, yaitu memiliki 3 pasang kaki jalan yang berfungsi untuk mencapit, terutama dari ordo *Decapoda*, seperti *Litopenaeus chinensis*, *L. indicus*, dan *L. japonicus*.

Berdasarkan taksonomi, udang vannamei diklasifikasikan sebagai berikut: (Chan 2000; Van de Braak 2002).

<i>Kingdom</i>	: Animalia
<i>Phylum</i>	: Arthropoda
<i>Subphylum</i>	: Crustacea (Brünnich 1772)
<i>Class</i>	: Malacostraca (Latreille 1802)
<i>Subclass</i>	: Eumalacostraca (Grobber 1892)
<i>Superorder</i>	: Eucarida (Calman 1904)
<i>Order</i>	: Decapoda (Latreille 1802)
<i>Suborder</i>	: Dendrobranchiata (Bate 1888)
<i>Superfamily</i>	: Penaeoidea (Rafinesque 1815)

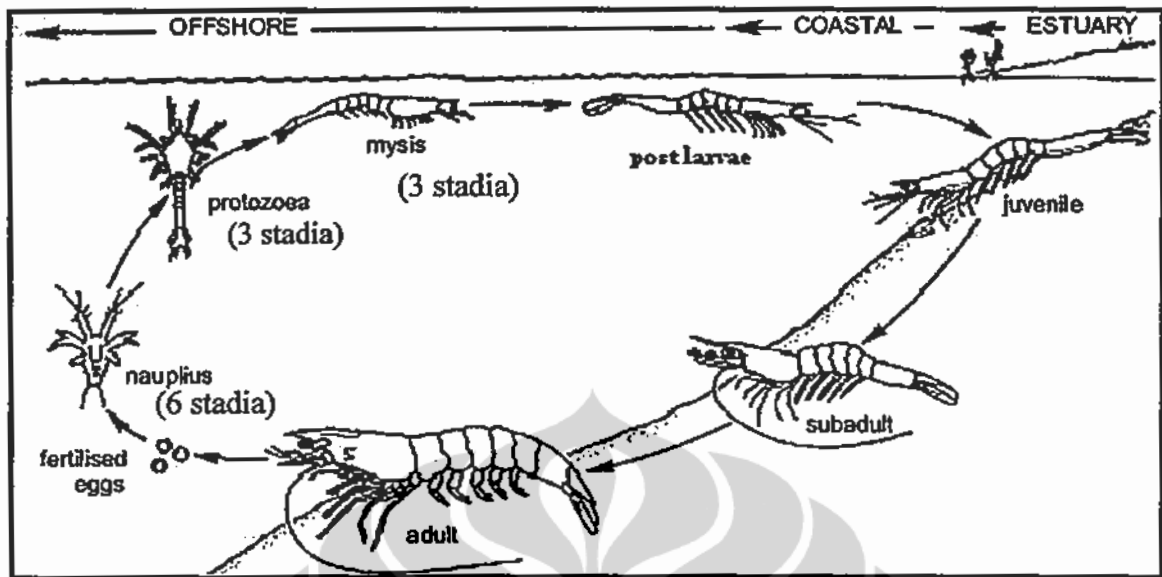
*Family* : Penaeidae (Rafinesque 1815)  
*Genus* : *Litopenaeus* (Pérez Farfante 1969)  
*Species* : *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931)



**Gambar 1.** Udang vannamei [sumber: dokumentasi pribadi].

### **Morfologi dan siklus hidup**

Tubuh udang vannamei dibentuk oleh dua cabang (*biramous*) yaitu *exopodite* dan *endopodite*. Vannamei memiliki tubuh berbuku-buku dan aktivitas berganti kulit luar atau *eksoskeleton (moulting)* secara periodik (Van de Braak 2002). Udang vannamei dewasa memiliki berat 30-45 gram, dapat menghasilkan sekitar 100-250 ribu butir telur yang berdiameter 0,22 mm. Udang vannamei mengalami beberapa stadia dalam siklus hidupnya, yaitu stadium *nauplius*, stadium *protozoa*, stadium *mysis* dan stadium *post larva* (PL) (Gambar 2) (Fegan 1999; Van de Braak 2002).



Gambar 2. Siklus hidup udang vannamei [sumber : Van de Braak 2002].

Saat stadium *nauplius*, larva udang memiliki ukuran panjang 0,32-0,58 mm. Stadium tersebut memiliki 6 sub stadia, yaitu nauplius 1, hingga nauplius 6. Sistem pencernaannya belum sempurna dan masih memiliki cadangan makanan berupa kuning telur sehingga pada stadium ini udang belum membutuhkan makanan dari luar (Van de Braak 2002). Stadium *Protozoa*, terjadi setelah *nauplii* ditebar di bak pemeliharaan sekitar 15-24 jam. Larva sudah berukuran 1,05-3,30 mm. Pada stadium tersebut, benih udang mengalami pergantian kulit (*moulting*) sebanyak 3 kali, yaitu sub stadia *protozoa* 1, 2 dan 3, periode proses pergantian kulit sebelum memasuki stadium berikutnya (*mysis*) sekitar 4-5 hari. Pada stadium tersebut, larva sudah dapat diberikan pakan alami seperti, *Skeletonema costatum* (Van Stappen 1996). Pada stadium *mysis*, benih sudah menyerupai bentuk udang yang dicirikan dengan sudah terlihatnya ekor kipas (*uropods*) dan ekor (*telson*).

Larva pada stadium tersebut sudah mampu memakan pakan fitoplankton dan zooplankton. Ukuran larva berkisar 3,50-4,80 mm. Stadium tersebut memiliki 3 sub stadia, yaitu *mysis* 1, 2 dan 3, yang berlangsung selama 3-4 hari sebelum masuk stadium *postlarva* (PL). Pada stadium *postlarva* (PL), benih sudah tampak seperti udang dewasa. Hitungan stadium yang digunakan sudah berdasarkan hari (Direktorat Jenderal Perikanan 1987). Misalnya PL<sub>1</sub>, berarti *postlarva* tersebut berumur 1 hari. Pada stadium tersebut udang sudah mulai aktif bergerak lurus ke depan. Pada stadium PL, sifatnya cenderung karnivora. Petambak umumnya akan menebar PL<sub>10</sub>-PL<sub>15</sub> yang sudah memiliki ukuran panjang ±10 mm (Van de Braak 2002).

Udang berenang menggunakan kaki jalan yang memiliki capit mencari sumber pakan. Pakan langsung dijepit menggunakan capit kaki jalan, kemudian dimasukkan ke dalam mulut. Pakan yang berukuran kecil masuk ke dalam kerongkongan dan *esophagus*. Bila pakan yang dikonsumsi berukuran lebih besar dari bukaan mulutnya, maka pakan tersebut akan dicerna secara mekanik terlebih dahulu dengan bantuan *maxilliped* di dalam mulutnya (Chan 2000).

Pigmentasi atau perubahan warna kulit pada udang vannamei berhubungan erat dengan kesehatan udang. Warna kulit dapat digunakan sebagai acuan kualitas udang yang akan dipanen, seperti nilai gizi, kesegaran, dan rasa. Warna kulit udang yang sehat terlihat cerah dan tidak pucat. Warna udang dipengaruhi oleh *chromatophore* yang terdapat pada sel-sel epidermis di dalam tubuhnya (Van de Braak 2002). Pigmen utama udang vannamei adalah

*karotenoid*. Pigmen tersebut semakin berkurang seiring pertumbuhan udang akibat proses pergantian kulit.

## **PEMBUDIDAYAAN UDANG**

Budidaya udang penaeid dilakukan oleh pembudidaya dengan memanfaatkan lahan yang berada dalam areal pasang surut air laut. Komoditas unggulan udang didominasi oleh famili *Penaedae*, yaitu: udang windu (*P. monodon*), udang putih vannamei (*L. vannamei*), udang kuruma (*P. japonicus*), dan udang putih cina (*P. chinensis*). Keberhasilan budidaya dipengaruhi oleh beberapa faktor di antaranya: biota yang dipelihara, wadah/lahan dan lingkungan yang digunakan, keadaan iklim setempat, desain dan konstruksi fasilitas yang digunakan, ketersediaan sarana, keahlian pelaksana, manajemen usaha dan pemasaran hasil.

Teknologi yang diterapkan dalam budidaya udang hingga sekarang adalah teknologi ekstensif hingga teknologi intensif (Van de Braak 2002). Pemilihan teknologi pada umumnya disesuaikan dengan target produksi yang ingin dicapai serta kondisi lahan yang tersedia. Pada teknologi ekstensif, campur tangan manusia masih sangat terbatas. Parameter lingkungan perairan seperti oksigen terlarut, pH, temperatur air masih sangat alami (Rodríguez dkk. 2007). Pakan sebagai sumber energi untuk hidup dan berkembang seluruhnya berupa pakan alami yang tumbuh karena kesuburan tambak tersebut. Produktivitas tambak yang menerapkan teknologi tersebut rendah yaitu sekitar 200 kg/ha/musim tanam (Cholik dkk. 2005).



Ketergantungan pada kondisi alam semakin jauh berkurang dalam aplikasi teknologi intensif. Pada tipe budidaya ini, manajemen kualitas air diperbaiki dengan menggunakan *aerator* seperti kincir air, *blower*, dan *turbo* (Cholik dkk. 2005). Penggunaan aerator tersebut karena densitas udang sangat tinggi dan pemberian pakan buatan juga sangat intensif sehingga cenderung mengakibatkan terjadinya penurunan kualitas air tambak secara drastis, seperti penurunan oksigen terlarut dalam air, peningkatan kandungan nitrogen (N), bahan organik, dan turbiditas. Kondisi tersebut sangat berpotensi mencemari lingkungan dan menyebabkan berkembangnya patogen yang akan diikuti dengan berjangkitnya suatu penyakit (Van de Braak 2002).

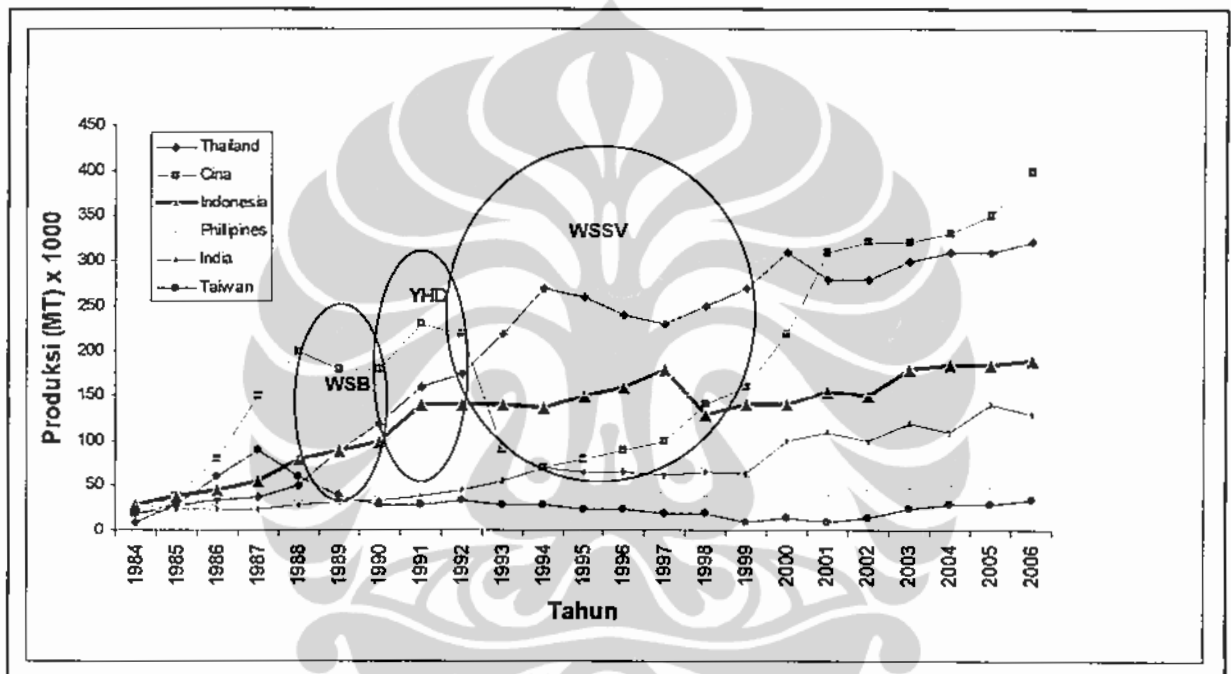
Sejak tahun 2000-an, lebih dari 85% produksi udang budidaya masih dihasilkan dari negara-negara Asia Tenggara, terutama Thailand yang merupakan penghasil terbesar, disusul oleh Cina, Indonesia, India, dan Vietnam (FAO 2007). Ekuador merupakan penghasil terbesar kawasan Amerika. Budidaya udang saat ini mulai berkembang ke kawasan Afrika dan Timur Tengah (Madagaskar, Iran dan Mesir) (Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya 2008).

## **PENYAKIT PADA UDANG**

Penyakit pada udang disebabkan oleh beberapa faktor, yaitu: virus, bakteri, fungi, protozoa, nutrisi, toksik dan penyakit lingkungan (*toxic and environmental disease*) (Schnieszko 1974). Berkembangnya suatu penyakit seringkali disebabkan beberapa faktor stres, seperti densitas yang terlalu tinggi

(>200/M<sup>2</sup>, untuk udang vannamei), fluktuasi temperatur air yang lebar (>2 °C/hari) dan rendahnya kandungan oksigen terlarut (<3 mg/l) dalam air (Lightner 1993).

Beberapa penyakit udang yang banyak berpengaruh terhadap produksi udang di Asia (Gambar 3) adalah: *white spot baculovirus* (WSB), *yellow head disease* (YHD) dan *white spot syndrome virus* (WSSV) (FAO 2007).



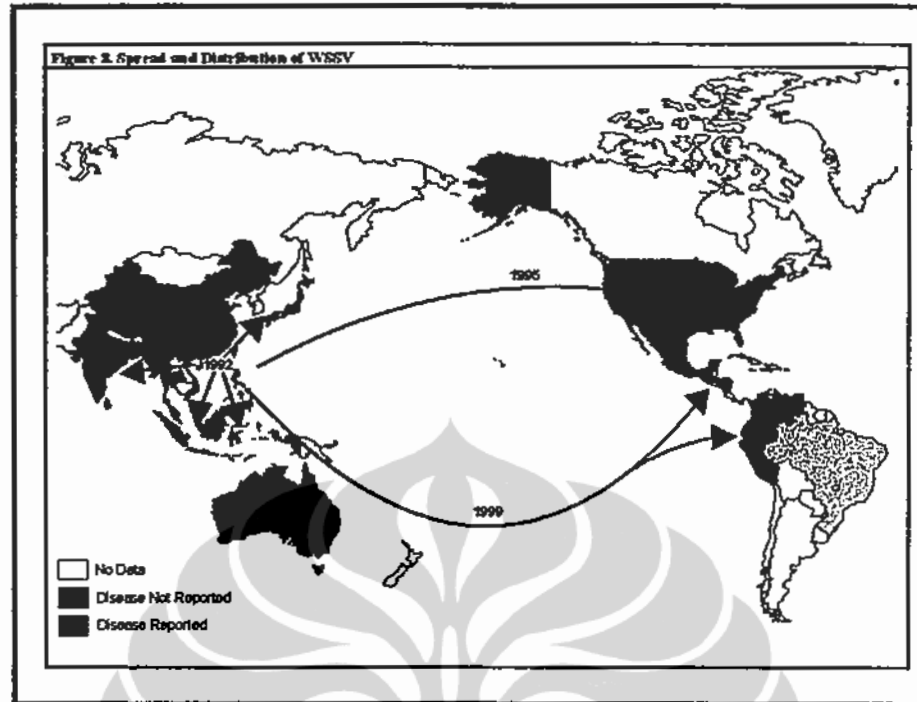
**Gambar 3.** Produksi udang (penaeid) di Asia dan beberapa penyakit penting pada udang [Sumber: FAO 2007].

Ketiga jenis penyakit tersebut menurunkan produksi global udang di Asia. Dua negara yaitu China dan Thailand yang dapat kembali meningkatkan produksi udang pasca wabah WSSV. Indonesia (ditunjukkan dengan garis pink), hingga saat ini masih memiliki masalah dengan serangan virus WSSV (Rodríguez dkk. 2007), meskipun kebijakan pemerintah melalui Departemen

Kelautan dan Perikanan telah mengintroduksi udang vannamei (*L. <sup>v</sup>annamei*) untuk menggantikan komoditas udang windu (*P. monodon*). Udang vannamei dipilih karena beberapa alasan, yaitu: memiliki karakteristik fisiologis yang hampir sama dengan udang windu, dan mampu memanfaatkan kolom air. Namun ternyata udang vannamei juga rentan terhadap serangan WSSV (Van de Braak 2002; Rordriguez 2007).

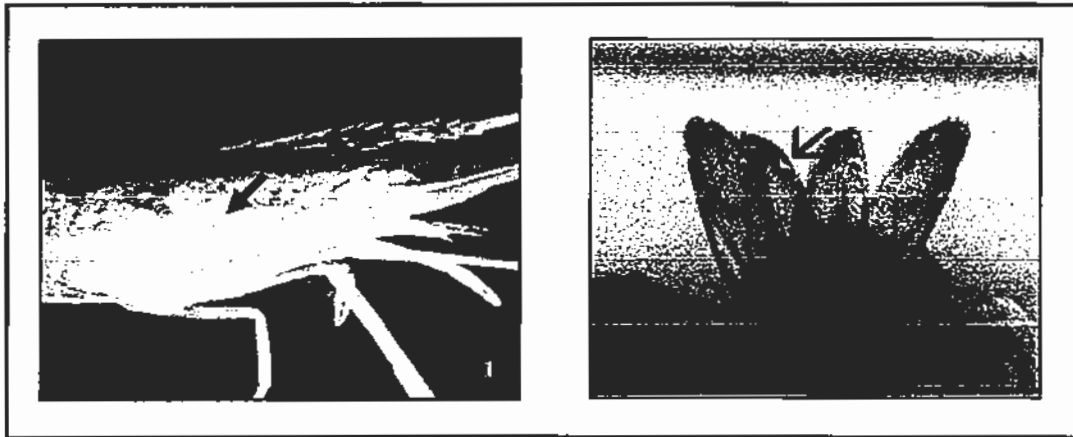
Penyakit *white spot syndrome* (WSS) disebabkan oleh virus berbentuk batang yang kemudian dikenal dengan sebutan *white spot syndrome virus* (WSSV), termasuk famili *Nimaviridae* dan genus *Whispovirus* (Witteveldt dkk. 2004). WSSV memiliki *virion* berbentuk batang dengan ukuran 80-120 x 250-380 nm. Virus tersebut memiliki genom DNA berbentuk filamen bulat ganda (*circular double stranded*) berukuran 292.967 pasangan basa (Witteveldt 2006). Virus tersebut dapat menular dari udang ke udang atau peralatan yang dipergunakan.

Penyakit WSSV mulai terdeteksi pada pertambakan udang di Asia pada tahun 1992, kemudian menyebar dengan cepat ke belahan benua Australia pada tahun yang sama dan ke benua Amerika pada tahun 1995 dan 1999 (Gambar 4).



Gambar 4. Penyebaran dan distribusi penyakit WSSV [Mc Clennen 2004].

Virus WSSV dapat dideteksi dengan pemeriksaan laboratorium menggunakan metode PCR (*polymerase chain reaction*) dengan primer spesifik WSSV yang berasal dari gen struktural *envelope protein VP28* dari organisme *shrimp white spot syndrome virus* (Lo dkk. 1996; OIE 2005). Gejala klinis serangan infeksi WSSV adalah adanya bintik putih pada bagian epidermal bagian dalam karapas udang (Lightner 1996), sedangkan seluruh tubuh udang berubah menjadi kemerahan. Pada tahap awal serangan infeksi penyakit tersebut, udang kehilangan nafsu makannya dan cenderung berada di permukaan air tambak dalam kondisi lemah (Magbanua dkk. 2000) (Gambar 5).



**Gambar 5.** Penampakan udang yang terkena serangan WSSV [Sumber: Lightner 1996]. Keterangan: tanda panah menunjukkan bintik putih pada udang.

WSSV terdeteksi pada beberapa spesies udang penaeid yaitu:

*P. monodon*, *P. japonicus*, *P. chinensis* (=orientalis), *P. indicus*, *P. merguensis*, *P. setiferus* dan *L. vannamei* (Rordriguez dkk. 2007). Berjangkitnya penyakit pada akuakultur semakin banyak disadari sebagai penghambat utama produksi dan perdagangan produk akuakultur yang berpengaruh terhadap perkembangan sektor ekonomi di banyak negara (Subasinghe & Arthur 1997). Penyakit tersebut saat ini merupakan masalah serius dalam budidaya udang baik pada skala pembenihan maupun pembesaran di tambak (Magbanua dkk. 2000; Goevanny dkk. 2007).

Berkembangnya penyakit dipicu oleh penerapan teknologi udang secara intensif untuk memenuhi target produksi agar mampu bersaing dengan produsen dari negara-negara lain seperti Thailand dan China, di samping kurangnya pengetahuan tentang teknik budidaya yang baik dan benar, dan

ramah lingkungan (*sustainable aquaculture*) (Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya 2008).

Penentuan kesehatan udang yang dilakukan oleh pembudidaya udang secara umum dilakukan berdasarkan tingkat kelangsungan hidup (*survival rate*), kematian udang (*mortality*), laju pertumbuhan (*growth rate*), variasi ukuran (*size variation*), konversi pakan (*feed conversion ratio*), visualisasi/tampilan udang (*shrimp performances*), dan efek dari lingkungan terhadap kesehatan udang (Brock & Main 1994). Indikator lainnya adalah: uji stres, pengamatan histologi organ insang (*gill histological observation*), dan pengamatan terhadap isi usus udang (*gut content examination*) (Lightner 1996; Lo dkk. 1996).

Penyakit WSSV dapat dideteksi lebih spesifik dengan *wet-mount microscopy*, histopatologi, mikroskop elektron, metode imunitas, dan teknologi berbasis DNA seperti amplifikasi menggunakan metode *polymerase chain reaction* (PCR) (Kimura 1996). Deteksi berbasis DNA memiliki beberapa keuntungan yaitu: tingkat akurasi yang tinggi sehingga tidak menimbulkan kesalahan dalam penanggulangan penyakitnya (Tirola dkk. 2002).

## **PENANGGULANGAN PENYAKIT UDANG**

Penggunaan zat kimia seperti *chlorine* dan antibiotik (*chloramphenicol* dan *oxytetracycline*), masih diandalkan untuk mengendalikan penyakit akuakultur (Ajitha dkk. 2004), meskipun tingkat keberhasilannya terbatas. Penggunaan antibiotik yang tidak tepat akan meningkatkan kekhawatiran terhadap keamanan pangan dan kesehatan masyarakat. Penggunaan

antibiotik untuk keperluan pencegahan (*prophylactic*) seperti pencegahan penyakit dan memacu pertumbuhan yang terus meningkat, menyebabkan tekanan selektif pada mikroorganisme yang menyebabkan resistensi pada mikroorganisme (Yoshida dkk. 1995; Sahul-Hameed dkk. 2003; Balcázar dkk. 2006).

Strategi pengendalian penyakit untuk akuakultur yang telah dilakukan dan berhasil dengan baik di antaranya adalah: (1) penerapan cara berbudidaya yang baik dan benar (*better aquaculture practices*), (2) penggunaan hewan yang secara genetik resisten terhadap penyakit, (3) manajemen pemberian pakan yang baik, (4) penggunaan vaksin, (5) penggunaan imunostimulan non spesifik (6) mengisolasi hewan yang terinfeksi (7) penambahan senyawa-senyawa tertentu, dan (8) penggunaan probiotik atau agen bio (Rengpipat dkk. 2000; Verschueren dkk. 2000; Namikoshi dkk. 2004).

Penggunaan vaksin (*immunoprophylaxis*) saat ini banyak digunakan untuk pengendalian sejumlah bakteri patogen penyebab penyakit ikan. Beragam produk saat ini sudah tersedia secara komersial antara lain adalah vaksin untuk pengendalian *vibriosis* (*V. anguillarum*, *V. ordalii* dan *V. salmonicida*), *Edwardsiellosis* dan *Streptokosis* (Namikoshi dkk. 2004). Namun, vaksin khusus untuk udang belum dilaporkan, karena udang memiliki sistem imun non spesifik, yaitu sistem imun yang mencakup selular yang terdiri dari aktivitas fagositosis oleh hemosit (sel darah udang), nodulasi dan enkapsulasi dan humoral yang terdiri dari *prophenoloxidase* (*proPO*), *phenoloxidase* (*PO*), *lectin* dan *agglutinin* (Van de Braak 2002).

Vaksin yang digunakan untuk akuakultur pada umumnya menggunakan suspensi sel utuh yang di-inaktivasi dengan formalin. Namun terdapat pula teknik lainnya, yaitu menggunakan sel-sel yang ditumbuhkan pada media dengan kandungan Fe sangat terbatas atau dengan media yang ditambah Fe. Salah satu contoh keberhasilan vaksin adalah untuk mencegah serangan *Aeromonas salmonicida*. Penggunaan vaksin dari komponen-komponen sub-selular misalnya ekstrak lipopolisakarida, DNA dan sel-sel yang mengalami manipulasi genetik juga menunjukkan prospek yang baik untuk menekan serangan penyakit pada akuakultur (Namikoshi dkk. 2004).

Selain penggunaan vaksin, pemberian nutrisi tambahan berupa senyawa-senyawa tertentu juga dilakukan berbagai upaya untuk meningkatkan resistensi ikan terhadap penyakit. Salah satu di antaranya adalah vitamin C. Menurut Subasinghe & Arthur (1997), Moriarty (1998), dan Atmomarsono dkk. (2004), vitamin C telah terbukti meningkatkan resistensi ikan terhadap penyakit, terutama penyakit-penyakit yang disebabkan oleh infeksi bakteri Gram negatif. Namun aplikasi vitamin C relatif bermasalah di lapangan karena sifat dari vitamin C yang sangat mudah larut dalam air (*highly water soluble*) (Atmomarsono 2004).

Alternatif lain yang digunakan dalam pengendalian penyakit adalah penggunaan senyawa kemoterapeutik agen profilaktik seperti *imunostimulan*. Penggunaan *imunostimulan* merupakan salah satu bentuk respon terhadap meningkatnya kekhawatiran masyarakat terhadap penggunaan antibiotik yang tidak terkendali. Imunostimulan non-spesifik, seperti ekstrak agar,  $\beta$ -glukan,



lipopolisakarida (LPS), dan alga uniselular serta faktor lingkungan (manipulasi suhu air) (Le Moullac & Haffner 2000), telah terbukti meningkatkan daya tahan ikan terhadap penyakit dan menstimulasi sistem imun, terutama dengan meningkatkan aktivitas makrofag dan limfosit (Chang dkk. 1999).

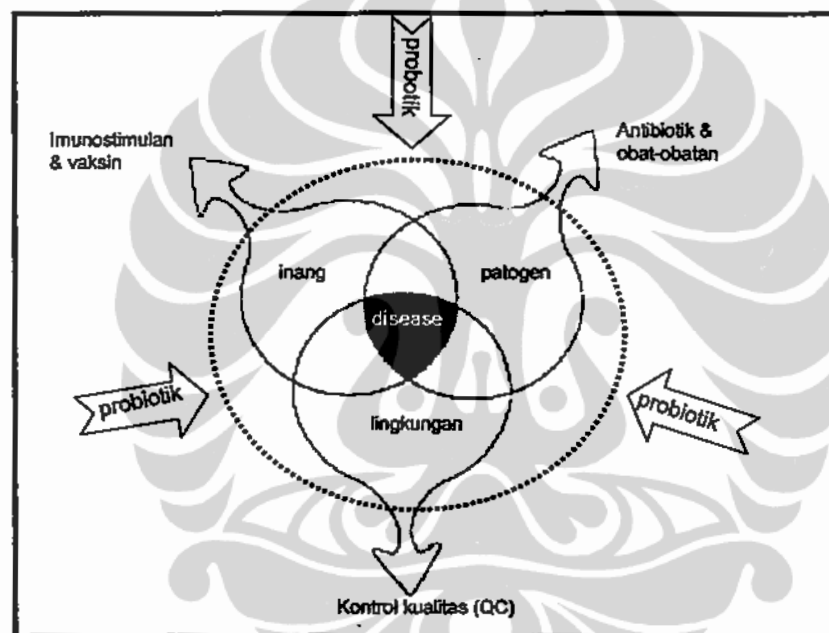
## PROBIOTIK

Alternatif lain yang dikembangkan dalam pengendalian penyakit pada udang adalah probiotik. Beberapa penerapan probiotik, dalam akuakultur terbukti mampu meningkatkan resistensi udang, ikan, dan biota akuakultur lainnya terhadap serangan infeksi (Rengpipet dkk. 2000; Verschuere dkk. 2000).

Gram dkk. (1999) mendefinisikan probiotik sebagai pakan tambahan berupa sel mikroorganisme hidup yang menguntungkan bagi inangnya dengan cara menyeimbangkan populasi mikrobiologis pada inangnya. Tahun 2000, Gatesoupe (*lihat* Verschuere dkk. 2000) mendefinisikan probiotik sebagai sel-sel mikroorganisme yang diberikan dengan cara tertentu agar masuk ke saluran *gastrointestinal* dan tetap hidup dengan tujuan memperbaiki kesehatan.

Sementara Verschuere dkk. (2000) mendefinisikan probiotik sebagai penambahan mikroorganisme hidup yang memiliki pengaruh menguntungkan bagi inang melalui modifikasi bentuk asosiasi dengan inang atau komunitas mikroorganisme lingkungan hidupnya, mengoptimalkan penggunaan pakan atau meningkatkan nilai nutrisinya, berkompetisi dengan mikroorganisme yang merugikan untuk mendapatkan nutrien, energi atau tempat, meningkatkan

kekebalan, memperbaiki kualitas air dan mampu berinteraksi dengan phytoplankton. Secara skematik mekanisme kerja dari probiotik dapat dilihat pada Gambar 6 yang menunjukkan bahwa probiotik dapat diterapkan melalui tiga faktor yang mempengaruhi penyakit yaitu: dapat diterapkan langsung terhadap patogen melalui produksi komponen penghambat dan kompetisi, diterapkan pada lingkungan melalui perbaikan kualitas air, dan dapat diterapkan langsung ke inang melalui peningkatan respon imunitas.



**Gambar 6.** Skema aplikasi probiotik pada pembudidayaan udang dikaitkan dengan tiga faktor yang mempengaruhi dalam mekanisme terjadinya penyakit secara alamiah. [sumber: Van de Braak 2002, yang telah dimodifikasi].

Beberapa karakteristik penting dari bakteri probiotik yang akan diaplikasikan di antaranya adalah: (1) tidak bersifat patogen atau mengganggu inang; (2) tidak bersifat patogen untuk konsumen; (3) tidak mengganggu keseimbangan ekosistem setempat; (4) mikroorganisme tersebut dapat dan mudah dipelihara dan diperbanyak; (5) dapat hidup dan bertahan serta

berkembang biak di dalam usus inangnya; (6) mampu hidup pada kisaran pH yang lebar; (7) dapat dipelihara dalam media yang memungkinkan untuk diintroduksi ke dalam usus inangnya; (8) dapat hidup dan berkembang di dalam wadah pemeliharaan ikan; (9) dapat disiapkan sebagai produk sel hidup pada skala industri; (10) dapat terjaga kemampuannya dan dapat bertahan untuk waktu simpan yang lama pada penyimpanan maupun di lapangan (Verschuere dkk. 2000; Feliatra dkk. 2004). Penelitian tentang aplikasi probiotik dalam akukultur telah banyak dilaporkan (Verschuere dkk. 2000; Balcázar dkk. 2006). Beberapa obyek yang dijadikan penelitian tersebut di antaranya adalah : (1) telur ikan dan larva, (2) juvenil ikan dan dewasa, (3) *crustacea*, (4) moluska, (5) pakan hidup (*Artemia*), (6) interaksi dengan efek nutrisi, (7) media pemeliharaan yang telah dikondisikan (*matured water culture*).

Probiotik dapat diaplikasikan dalam beberapa cara yaitu: (1) ditambahkan dalam pakan buatan (2) ditambahkan ke dalam air pemeliharaan, (3) lewat perendaman, dan (4) ditambahkan pada pakan hidup (*live food*) (Geovanny dkk. 2007). Pada umumnya bakteri yang sering dijadikan sebagai probiotik adalah *Lactic acid bacteria* (LAB); genus *Lactobacillus*. Namun beberapa genus lain mulai banyak digunakan sebagai bakteri probiotik di antaranya: genus *Carnobacterium*, *Vibrio* (*Vibrio alginolyticus.*), *Bacillus*, *Micrococcus*, dan *Pseudomonas* (Gullian dkk. 2004).

Penelitian tentang probiotik secara umum, masih belum terdokumentasikan dengan baik. Hal tersebut karena belum terjawab secara tuntas model kerja (*action modes*) dari probiotik tersebut. Verschuere dkk.

(2000) dan Balcázar dkk. (2006) menyajikan beberapa mekanisme kerja probiotik bakteri sebagai berikut:

(1) Memproduksi komponen penghambat:

Pada tahun 1981, Fredrickson & Stephanopoulos (*lihat Verschuere dkk. 2000*) menyatakan bahwa populasi mikroorganisme diduga mampu mengeluarkan zat kimia yang mampu menghambat (*bacteriostatic*) atau mematikan (*bactericidal*) terhadap populasi mikroorganisme lainnya, yang dapat mengubah hubungan antar populasi dengan cara berkompetisi terhadap ruang dan nutrien. Kehadiran dari bakteri yang memproduksi zat penghambat di dalam usus inang diduga menghambat perkembangbiakan bakteri patogen. Secara umum efek anti bakteri dihasilkan oleh antibiotik (Ziaei-Nejad dkk. 2005), *bacteriocins* (Gatesoupe 1999), *lysozymes*, *proteases* dan hidrogen peroksida (Gordon Vine 2004).

Bakteri asam laktat (LAB) diketahui mampu memproduksi komponen seperti *bacteriocins* yang mampu menghambat pertumbuhan mikroorganisme (Verschuere dkk. 2000) terutama terhadap bakteri patogen dari kelompok Gram negatif. Selain *bacteriocins*, beberapa bakteri juga mampu memproduksi enzim *bacteriolytic* yang mampu menghambat pertumbuhan *Vibrio parahaemolyticus*. Pada tahun 1985, Imada dkk. (*lihat Verschuere dkk. 2000*) melaporkan telah berhasil mengisolasi dan mengkarakterisasi bakteri *Alteromonas sp.* strain B-10-31 dari pantai di Jepang yang menghasilkan *monastatin* (penghambat basa *protease*). Pada percobaan *invitro*, *monastatin* mampu menghambat

aktivitas protease dari *Aeromonas hydrophila* dan *thiol protease* dari *Vibrio anguillarum*. Kedua bakteri tersebut merupakan patogen pada ikan.

(2) Kompetisi untuk zat kimia tertentu atau energi yang tersedia:

Pada tahun 1981, Fredrickson & Stephanopoulos (*lihat Verschuere dkk. 2000*) menyatakan bahwa kompetisi terhadap zat kimia tertentu (nutrien) atau energi yang tersedia akan menentukan perbedaan populasi dari mikroorganisme dalam ekosistem yang sama. Kompetisi terhadap nutrien secara teori memiliki peran penting terhadap komposisi dari mikroorganisme pada saluran pencernaan atau lingkungan dari spesies yang dipelihara. Ekosistem mikroorganisme pada lingkungan akuakultur secara umum didominasi oleh bakteri *heterotroph* yang berkompetisi untuk substrat organik berupa karbon sebagai sumber energi.

Verschuere dkk. (1999) meneliti beberapa bakteri (*Vibrio sp.* dan *Bacillus sp.*) yang memiliki efek positif terhadap kelangsungan hidup dan pertumbuhan juvenil *Artemia*. Bakteri tersebut diuji terhadap bakteri patogen *Vibrio proteolytics* CW8T2. Hasil pengujian mereka menunjukkan bahwa bakteri *Vibrio proteolytics* CW8T2 tidak dapat tumbuh dan berkembang. Penjelasan di atas menunjukkan bahwa strain bakteri *Vibrio sp.* dan *Bacillus* tersebut telah berkompetisi dengan bakteri patogen *Vibrio proteolytics* CW8T2 untuk mendapatkan zat kimia tertentu dan energi yang tersedia (Verschuere dkk. 2000).

### (3) Kompetisi mendapatkan tempat:

Mekanisme lain yang mungkin untuk mencegah kolonisasi oleh mikroorganisme patogen adalah kompetisi mendapatkan ruang hidup pada usus atau permukaan jaringan lainnya. Kemampuan berkompetisi ruang telah banyak dilaporkan seperti pada bakteri *Camobacterium* strain KI yang berkompetisi dengan patogen *Vibrio anguillarum* dan *Aeromonas hydrophila* (Verschuere dkk. 2000; Apostolou dkk. 2001). Douillet (2000) melaporkan bahwa Rotifer yang diberikan tambahan bakteri strain *Alteromonas* dan gabungan beberapa strain lain mampu meningkatkan pertumbuhannya dibandingkan dengan tanpa penambahan bakteri probiotik.

### (4) Meningkatkan respon imunitas:

Imunostimulan merupakan komponen kimia yang mengaktifkan sistem imun pada organisme, sehingga lebih resisten terhadap infeksi patogen (Raa 1998). Larva ikan, udang, dan invertebrata lainnya, memiliki sistem imun yang kurang berkembang dibandingkan dengan ikan dewasa dan lebih banyak menggantungkan diri pada respon imun non spesifik untuk mempertahankan dari serangan infeksi (Johansson dkk. 2000; Rengpipat dkk. 2000).

Beberapa percobaan terhadap organisme berdarah panas menunjukkan bahwa bakteri probiotik asam laktat (LAB) yang diberikan secara oral mampu meningkatkan resistensi terhadap serangan infeksi (Cunningham-Rundles dkk. 2000; de Vrese & Marteau 2007). Terdapat beberapa laporan tentang bakteri yang digunakan sebagai imunostimulan pada ikan dan udang.

Rengpipat dkk. (2003) melaporkan bahwa bakteri *Bacillus* sp., *Bacillus subtilis* BT23 yang diberikan kepada udang windu mampu meningkatkan pertumbuhan dan resistensi terhadap patogen *Vibrio*. Hal tersebut dimungkinkan oleh adanya pengembangan sistem imun pada udang windu tersebut. Meskipun model kerja meningkatkan imunitas inang masih belum jelas dan belum banyak informasi yang diperoleh dari probiotik bakteri, tetapi model tersebut penting untuk dikaji lebih jauh, mengingat udang memiliki sistem pertahanan tubuh yang masih sederhana.

(5) Memperbaiki kualitas air:

Bakteri *Bacillus* spp. merupakan salah satu contoh yang banyak diaplikasikan sebagai probiotik yang mampu memperbaiki kualitas air, karena bakteri tersebut lebih efisien mengkonversi bahan organik menjadi CO<sub>2</sub> dibandingkan dengan bakteri Gram negatif (Holt dkk.1994). Namun demikian, beberapa studi yang menggunakan salah satu atau lebih bakteri seperti *Bacillus*, *Nitrobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Cellulomonas* dan *Rhodopseudomonas* spp. dalam budidaya udang tidak selalu memberikan dampak yang sama. Bakteri-bakteri tersebut di atas hanya mampu melakukan proses nitrifikasi (Rengpipat dkk.1998).

Aplikasi bakteri probiotik untuk proses nitrifikasi sudah banyak dilakukan secara komersial, terutama para pencinta ikan hias akuarium. Bakteri nitrifikasi sering pula diaplikasikan pada kolam yang secara insidental memiliki konsentrasi amoniak atau nitrit yang tinggi (Rengpipat dkk. 2000).

(6) Berinteraksi dengan fitoplankton:

Beberapa peneliti menyebutkan bahwa banyak strain bakteri memiliki efek *algicidal* terhadap mikroalga, terutama plankton *red tide*. (Munro dkk. 1995). Bakteri yang memiliki sifat antagonis terhadap *algae* akan sangat merugikan sistem budidaya *green water technique*, tetapi akan sangat menguntungkan untuk alga yang tidak diharapkan berada pada kolam pemeliharaan. Boyd dkk. (1998) menyatakan bahwa suspensi campuran beberapa bakteri yang terdiri dari *Bacillus*, *Nitrobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Cellulomonas* dan *Rhodopseudomonas* spp. mampu menurunkan atau menekan populasi bakteri patogen *Cyanobacteria* pada kolam ikan *channel catfish*.

Aplikasi bakteri probiotik terhadap patogen yang disebabkan oleh virus, terutama *white spot syndrome virus* (WSSV) belum banyak dilakukan. Aplikasi bakteri probiotik masih diberikan sebagai tindakan pencegahan (*preventive*) bukan tindakan terapi (*curative*) penyakit (Balcázar dkk. 2006). Namun demikian perkembangan aplikasi probiotik sebagai terapi telah dilakukan pada dunia medis manusia dan mamalia besar. Aplikasi probiotik sebagai terapi dapat menjadi alternatif untuk mengatasi serangan infeksi WSSV pada udang.

Beberapa bukti bakteri probiotik dapat digunakan untuk terapi penyakit yang disebabkan infeksi bakteri dan virus telah dilaporkan. Marteau dkk. (2001), Isolauri dkk. (2002), Lisal (2005), Cunningham-Rundles dkk. (2000), de Vrese & Marteau (2007) menyatakan bahwa *Lactobacilli* dan *Bifidobacteria* dan khamir (*yeast*) *Saccharomyces boulardii* dapat menyembuhkan beberapa



gangguan penyakit pada organ lambung dan saluran pencernaan yang dikenal dengan istilah *gastrointestinal disturbances* yang disebabkan oleh infeksi bakteri maupun virus. Crane (2002) dan Dinkci dkk. (2006), melaporkan bahwa *Bifidobacterium animalis* BB-12 dan *Lactobacillus* GG dapat menyembuhkan penyakit radang karena alergi disertai dengan eksim (*atopic eczema*). Gordon pada tahun 2008 menyatakan bahwa bakteri probiotik dapat digunakan sebagai terapi pada bayi penderita HIV (*Human immunodeficiency virus*) yang belum mampu menerima obat-obatan berupa zat-zat kimia. Terapi diberikan melalui air susu ibu (ASI).

Beberapa penelitian mengenai aplikasi probiotik untuk meningkatkan kesehatan udang terhadap infeksi virus dilaporkan oleh Balcázar (2003) (lihat Balcázar dkk. 2006). Balcázar (2003) mendokumentasikan keberhasilan penggunaan probiotik berupa campuran bakteri *Bacillus* dan *Vibrio alginolyticus* mampu meningkatkan kelangsungan hidup dan pertumbuhan udang vannamei dan menekan patogen *Vibrio harveyi* dan WSSV di Ekuador. Pada penelitian Balcázar (2003), probiotik diberikan melalui pakan (*diet*), dan mampu meningkatkan aktivitas fagositosis dua kali lebih tinggi dibandingkan dengan udang tanpa pemberian bakteri.

Rodríguez dkk. (2007) melaporkan keberhasilan aplikasi probiotik bakteri dengan menggunakan *Vibrio alginolyticus* yang dicampur dengan  $\beta$ -1,3/1,6-*glucans* terhadap WSSV pada larva udang vannamei di Ekuador. Probiotik yang diberikan mampu meningkatkan respon imunitas udang dan

kelangsungan hidup udang dibandingkan dengan kontrol, yaitu udang yang tidak diberikan probiotik.

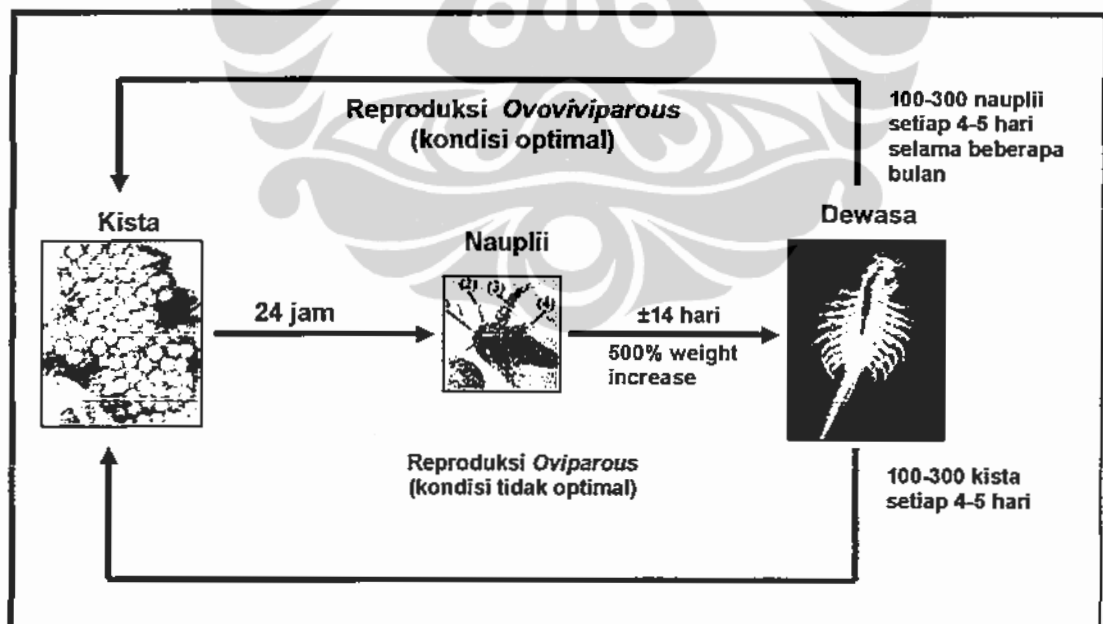
Penelitian probiotik di Indonesia pada udang belum banyak. Salah satu probiotik lokal yang ada adalah probiotik *Flavimonas* (BY-9). Bakteri tersebut diambil dari pesisir untuk meningkatkan daya tahan benih udang windu dan memperbaiki kualitas air (Sugama dkk.1998). Selbihnya hanya mengaplikasikan probiotik komersial yang berasal dari negara lain, seperti dari *INVE* Thailand dan *Behm Meyer* (bm) Jerman dan beberapa perusahaan dari negara lainnya.

Penggunaan probiotik lokal sangat menguntungkan ditinjau dari berbagai aspek, terutama dari aspek efektivitasnya (Verschuere dkk. 2000). Bakteri probiotik lokal mudah beradaptasi dengan kondisi lingkungan di Indonesia dibandingkan dengan bakteri probiotik impor, dan bakteri probiotik lokal juga mudah dalam pemeliharaan dan penyimpanannya.

Pengembangan aplikasi probiotik secara komersial pada akuakultur merupakan proses berjenjang dan multidisiplin serta membutuhkan riset secara empiris dan fundamental dengan pertimbangan teknis dan ekonomis. Tahapan secara garis besar dari seleksi dan pengembangan diawali dengan pengambilan isolat dari substrat tertentu, skrining, uji efikasi terhadap organisme target, uji efikasi terhadap organisme tingkat tropik yang berbeda (jika ada) dan identifikasi jenis bakteri yang diperoleh.

## PERANAN ARTEMIA DALAM AKUAKULTUR

*Artemia* merupakan *crustacea* tingkat rendah, (Van Stappen 1996) yang termasuk dalam *phylum Arthropoda*, *class Crustacea*, *order Anostraca*, *family Artemidae* dan *genus Artemia* dan merupakan komponen penting dalam akuakultur, terutama pada pembenihan udang penaeid, yaitu sebagai pakan hidup (*live food*). *Artemia* adalah organisme yang memakan makanannya dengan cara menyaring (*non selective filter feeder*) (Reeve 1963), dan hidup secara planktonik dalam perairan dengan kadar garam tinggi (Vanhaecke & Sorgeloos 1980), antara 150-300 ppt, dan memproduksi kista ketika keadaan lingkungan memburuk (Gambar 7) setelah mencapai ukuran dewasa (Van Stappen 1996). Kista akan menetas menjadi larva jika lingkungan memiliki kadar garam <150 ppt dan kandungan oksigen cukup.



Gambar 7. Siklus hidup *Artemia*. [sumber: adaptasi dari Sorgeloos, 1979].

*Artemia* memiliki peran sangat penting dalam kegiatan budidaya terutama pembenihan udang sebagai pakan hidup (*live food*). Peran penting tersebut karena, *Artemia* memiliki beberapa keuntungan di antaranya: ukuran sesuai dengan bukaan mulut ikan/udang, mudah dideteksi, mengandung nutrisi yang tinggi (Merchie 1996), hidup dan bergerak lambat sehingga atraktif untuk ikan/udang. *Artemia* juga dapat digunakan sebagai bioenkapsulator (kapsul hidup) untuk tujuan tertentu seperti pengaturan nutrisi, terapi, dan aplikasi probiotik (Lavens & Sorgeloos 2000).

Aplikasi *Artemia* dalam akuakultur dapat dilakukan dengan beberapa cara, yaitu: dalam bentuk kista dekapsulasi yang menipiskan cangkang kista *Artemia*, sehingga dapat diberikan langsung sebagai pakan untuk larva ikan; nauplii yang baru ditetaskan; meta nauplii; *juvenile* dan *Artemia* dewasa (Sorgeloos 1979).

#### **IDENTIFIKASI DAN ANALISIS FILOGENETIK BAKTERI**

Identifikasi bakteri merupakan aspek penting seiring dengan meningkatnya kegiatan akuakultur. Identifikasi jenis bakteri pada awalnya digunakan untuk kepentingan diagnosis penyakit ikan dan udang yang semakin berkembang seperti penyakit bercak merah dan cacar pada ikan air tawar (Cholik dkk. 2005) dan penyakit kunang-kunang pada udang (Lightner 1996). Identifikasi yang akurat sangat diperlukan untuk mengurangi kesalahan dalam menentukan langkah-langkah penanggulangan penyakit yang berkembang, sehingga dapat menekan kerugian usaha akibat serangan penyakit.

Metode identifikasi yang sering digunakan untuk mengidentifikasi bakteri adalah metode konvensional berdasarkan pada informasi fenotip seperti morfologi, fisiologi dan biokimia (Cowan 1974; Holt dkk. 1994). Metode konvensional ternyata memiliki beberapa kelemahan di antaranya, pekerjaan relatif kompleks (*laborious*), membutuhkan waktu relatif lama (*time consuming*), dan kurang akurat (*less accuracy*) (Nilsson & Strom 2002). Metode alternatif untuk mengidentifikasi bakteri adalah metode yang berdasarkan informasi karakter genotip, yaitu menggunakan asam nukleat (DNA dan RNA) sebagai sumber informasi (Tirola dkk. 2002). Metode identifikasi secara molekular dapat mengatasi kelemahan-kelemahan dari metode konvensional.

Keunggulan metode berdasarkan informasi genetik, di samping sederhana, singkat juga memiliki tingkat akurasi yang tinggi, karena berbasis informasi genetik (Angert dkk. 1998). Penentuan spesies didasarkan atas homologi *sequence* gen 16S *ribosomal RNA*  $\geq 97\%$  (Madigan dkk. 2000) dengan membandingkan target *sequence* dengan *sequence* terdekat (Macrae 2000) yang diperoleh dari database internasional seperti GenBank menggunakan program *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (Okamoto dkk. 2001).

Hasil *sequence* gen 16S *ribosomal RNA* dapat digunakan untuk membangun pohon filogenetik menggunakan metode *neighbour-joining* yang digunakan untuk mengetahui posisi isolat terhadap spesies-spesies yang berdekatan (Saitou & Nei 1987). Salah satu program yang digunakan untuk analisis pohon filogenetik adalah *Clustal X* (Saitou & Nei 1987; Holmes 2003).

Output dari program *Clustal X* tersebut ditampilkan dalam model menyerupai pohon (*tree-like style*) dengan Program Tree View (Holmes 2003).

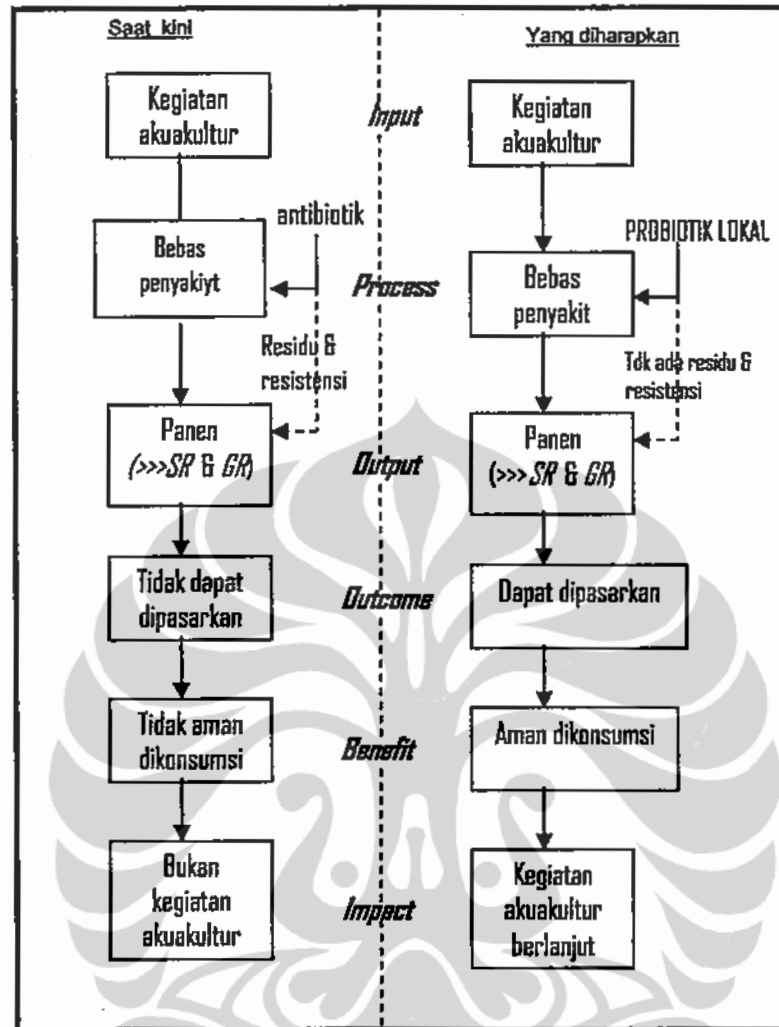
## KERANGKA PERMASALAHAN

Pengendalian penyakit pada budidaya udang di Indonesia pada umumnya masih menggunakan zat-zat kimia yang diatur berdasarkan Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan nomor: Kep02/MEN/2007 tentang cara budidaya ikan yang baik, dan Surat Edaran Direktur Jenderal Perikanan Budidaya, Departemen Kelautan dan Perikanan (DPB-DKP) nomor: 1697/DPB/TU.210.D4/IV/09 tentang residu substansi yang dilarang pada produk perikanan budidaya dan perikanan. Penyimpangan penggunaan zat-zat kimia seperti antibiotik, masih terjadi dalam akuakultur, terutama pada pertambakan udang. Penggunaan antibiotik yang tidak tepat akan terakumulasi pada udang dan menimbulkan resistensi pada mikroorganisme patogen yang berada di sekitarnya, sehingga hasil produksinya tidak mendukung kegiatan akuakultur yang berkelanjutan (Gatesoupe, 1999). Penyakit WSSV merupakan penyakit yang mematikan udang karena telah menyebabkan kematian masal di pertambakan udang di seluruh Jawa, Sumatera, Bali, Sulawesi, dan Kalimantan (Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya 2004) dan merupakan penyebab terbesar kegagalan budidaya udang di Indonesia sampai saat ini. Permasalahan pada pertambakan udang di Indonesia yang disebabkan oleh WSSV sudah sangat serius dan membutuhkan metode pengendalian penyakit yang efektif dan ramah lingkungan.

Pemanfaatan bakteri probiotik lokal dalam penanggulangan penyakit WSSV merupakan suatu alternatif yang sangat penting untuk dikaji lebih jauh. Pemilihan bakteri probiotik lokal didasarkan pada bakteri lokal lebih mudah beradaptasi terhadap ekosistem lingkungannya dibandingkan dengan bakteri impor, dan mudah dalam pemeliharaan dan penyediaannya. Salah satu mekanisme kerja dari bakteri probiotik adalah dapat meningkatkan respon imunitas, sehingga dapat digunakan sebagai dasar penggunaan probiotik sebagai agen terapi terhadap penyakit WSSV (Verschuere dkk. 2000). Selama ini bakteri probiotik hanya digunakan untuk tindakan pencegahan penyakit pada udang. Penggunaan bakteri probiotik sebagai agen terapi udang yang terinfeksi WSSV sampai saat ini belum pernah dilaporkan.

Penelitian penggunaan bakteri probiotik lokal (dari Jawa) untuk mengendalikan penyakit WSSV pada *L. vannamei* di Indonesia hingga saat ini belum dilaporkan. Isolat-isolat bakteri probiotik lokal yang memiliki kemampuan terapi terhadap penyakit WSSV pada udang sangat dibutuhkan oleh pembudidaya udang di Indonesia.

Secara skematis, kerangka permasalahan penelitian dapat dilihat pada Gambar 8 sebagai berikut:



**Gambar 8.** Skema kerangka pemmasalahan dalam budidaya udang vannamei di tambak, kondisi saat ini dan kondisi yang diharapkan.  
Keterangan: SR: *survival rate*; GR: *growth rate*.

## TUJUAN

Secara umum, tujuan penelitian ini adalah memperoleh isolat bakteri probiotik lokal (*indigenous probiotic*) yang berpotensi digunakan sebagai terapi pada udang vannamei terhadap serangan WSSV. Dalam rangka mencapai tujuan tersebut, maka dilakukan serangkaian penelitian sebagai berikut:



- (1) Mengisolasi bakteri probiotik lokal potensial dari beberapa lokasi pembudidayaan udang di Pulau Jawa dan melakukan seleksi isolat bakteri berdasarkan kelangsungan hidup udang.
- (2) Melakukan seleksi isolat bakteri probiotik lokal berdasarkan kemampuan terapi pada udang vannamei yang terinfeksi WSSV.
- (3) Meneliti pengaruh bakteri probiotik lokal potensial terhadap tingkat tropik yang lain dalam akuakultur (*Artemia salina*).
- (4) Mengidentifikasi jenis-jenis bakteri probiotik lokal terpilih untuk udang berdasarkan analisis *sequence* gen 16S *ribosomal* RNA.

## HIPOTESIS

Dalam penelitian ini diajukan beberapa hipotesis sebagai berikut:

- (1) Bakteri probiotik lokal potensial dapat diisolasi dari tempat pembudidayaan udang dan dapat diperoleh melalui seleksi berdasarkan kelangsungan hidup udang.
- (2) Bakteri probiotik lokal potensial yang diisolasi dapat diseleksi berdasarkan kemampuan terapi pada udang vannamei yang terinfeksi WSSV.
- (3) Bakteri probiotik lokal potensial hasil seleksi tidak memberikan pengaruh negatif terhadap tingkat tropik yang lain dalam akuakultur (*Artemia*).
- (4) Jenis-jenis bakteri probiotik lokal potensial dapat diidentifikasi menggunakan analisis gen 16S *ribosomal* RNA.

## HASIL YANG DIHARAPKAN

Hasil yang diharapkan dari penelitian ini adalah:

- (1) Memperoleh isolat bakteri lokal potensial dari lokasi pembudidayaan udang melalui seleksi berdasarkan kelangsungan hidup udang.
- (2) Memperoleh isolat bakteri lokal potensial yang memiliki kemampuan terapi pada udang vannamei yang terinfeksi WSSV.
- (3) Memperoleh informasi jenis-jenis bakteri probiotik lokal potensial menggunakan analisis *sequence* gen 16S *ribosomal* RNA.

Hasil penelitian ini diharapkan memberikan kontribusi terhadap masyarakat pembudidaya udang sebagai alternatif penggunaan zat-zat kimia dan antibiotik dalam peningkatan produksi udang vannamei, sehingga produknya lebih aman untuk konsumen.

Secara umum, penulisan disertasi ini terbagi menjadi empat makalah sesuai dengan tujuan dan hasil yang diharapkan, yaitu: 1) Isolasi bakteri dan seleksi kandidat probiotik lokal terhadap kelangsungan hidup udang vannamei, *Litopenaeus vannamei* (Boone); 2) seleksi bakteri probiotik lokal berdasarkan kemampuan terapi pada udang vannamei, *Litopenaeus vannamei* (Boone) yang terinfeksi *white spot syndrome virus* (WSSV); 3) uji efikasi bakteri probiotik lokal terhadap kualitas penetasan kista *Artemia*; dan 4) Identifikasi dan analisis filogenetik bakteri probiotik lokal untuk udang vannamei, *Litopenaeus vannamei* (Boone) berdasarkan data *sequence* gen 16S *ribosomal* RNA.

**MAKALAH I**

**ISOLASI BAKTERI DAN SELEKSI KANDIDAT PROBIOTIK LOKAL**

**TERHADAP KELANGSUNGAN HIDUP UDANG VANNAMEI**

***(Litopenaeus vannamei)* (Boone)**

# MAKALAH I

## ISOLASI BAKTERI DAN SELEKSI KANDIDAT PROBIOTIK LOKAL TERHADAP KELANGSUNGAN HIDUP UDANG VANNAMEI

*(Litopenaeus vannamei)* (Boone)\*

Tubagus Haeru Rahayu  
(0606037443)

### ABSTRACT

The objective of this study was to isolate and to select the putative indigenous probiotic bacteria towards shrimp's survival rate. A total of 136 isolates were obtained from the water, sediment and shrimp's gut of healthy wild shrimps ( $15 \pm 1$  g) collected from the districts of Pandeglang, Serang, Tangerang and Karawang. The putative probiotic effect was evaluated using post larvae (PL10) of *Litopenaeus vannamei* for 21 days with a bacterial concentration of  $10^8 \text{ ml}^{-1}$ . Two parameters, *i.e.* survival, and total amount of bacteria ( $\text{cfu.ml}^{-1}$ ) were evaluated to determine the effect of putative probiotic bacteria. Seventy one putative indigenous probiotic bacteria showed better results on the shrimp survival which were higher than 80.33% to 98.89% compared to the control (80.33%). In conclusion, some isolates have the opportunity to be selected further as putative probiotic bacteria.

Keywords: Isolation, selection, probiotic bacteria, *Litopenaeus vannamei*, survival of shrimps.

---

\* Makalah ini, dalam format lain telah dipresentasikan pada Seminar Internasional Perikanan 2007, 11-12 Desember 2007 di Jakarta dan diterbitkan pada Prosiding Seminar Internasional 2007 "Quality Management Systems, New Technology and International Marketing of Fish and Seafood Product. ISSN: 1978-7278.

## PENDAHULUAN

Berjangkitnya penyakit pada budidaya udang telah mengakibatkan menurunnya produksi dalam beberapa dekade terakhir ini. Peningkatan produksi di beberapa wilayah yang telah pulih dari serangan penyakit ternyata masih belum mampu menutupi produksi dari wilayah yang masih terjadi serangan penyakit. Produksi udang windu (*Penaeus monodon*) di Indonesia menurun sejak tahun 1996, yaitu 96.237 MT menjadi 93.757 MT pada tahun 2000 (Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya 2004), yang kemudian tidak terjadi peningkatan kembali hingga saat ini. Penurunan tersebut disebabkan oleh serangan penyakit yang diakibatkan oleh bakteri dan virus. Meskipun saat ini pemerintah telah mengintroduksi udang vannamei (*Litopenaeus vannamei*), ternyata tidak mampu mengembalikan produksi seperti halnya udang windu (Gullian dkk. 2004).

Sejak penggunaan antibiotik mengakibatkan dampak negatif terhadap kesehatan manusia dan berdampak buruk terhadap lingkungan, dan seiring dengan tuntutan pasar internasional tentang akuakultur yang berkelanjutan (*sustainable aquaculture*), rekam jejak proses budidayanya (*traceability*) dan keamanan pangan (*food safety*) (Gatesoupe 1999), banyak pembudidaya udang beralih menggunakan probiotik (Rengpipat dkk. 1998; Verschuere dkk. 2000) sebagai metode alternatif yang diyakini tidak menimbulkan dampak buruk terhadap manusia dan lingkungan. Penggunaan probiotik meningkat sejalan dengan maraknya tuntutan dari cara pembudidayaan ikan yang baik

(*better aquaculture practice*) (Gatesoupe 1999; Gulian dkk. 2004; Balcázar dkk. 2006).

Meskipun definisi probiotik masih banyak diperdebatkan (Irianto & Austin, 2002), namun secara umum probiotik didefinisikan sebagai penambahan mikroorganisme hidup yang memiliki pengaruh menguntungkan bagi inang melalui modifikasi bentuk keterikatan (*asosiasi*) dengan inang atau komunitas mikroorganisme lingkungan hidupnya, mengoptimalkan penggunaan pakan atau meningkatkan nilai nutrisinya, berkompetisi dengan mikroorganisme yang merugikan untuk nutrien, energi dan tempat melalui produksi komponen penghambat, meningkatkan respon imunitas (Rengpipat dkk. 2000), memperbaiki kualitas air dan mampu berinteraksi dengan fitoplankton (Verschuere dkk. 2000; Balcázar dkk. 2006).

Pembudidaya masih bergantung kepada penggunaan zat-zat kimia termasuk antibiotik, untuk mempertahankan status kesehatan pada pembudidayaan udang vannamei, sehingga produksi yang dihasilkan masih disangsikan untuk berkompetisi dalam pasar global yang mensyaratkan beberapa ketentuan di antaranya *sustainability*, *traceability* dan *food safety* (Gatesoupe 1999), untuk itu maka penanggulangan penyakit pada udang yang ramah lingkungan (*environmental friendly*) merupakan kebutuhan yang mendesak.

Penelitian probiotik pada udang, masih terfokus pada serangan infeksi bakteri, seperti bakteri *Vibrio harveyi* (Robertson dkk. 1998; Vasseeharan & Ramasamy 2003) yang menimbulkan kematian cukup serius terutama di

*hatchery* udang penaeid, dengan gejala spesifik air terlihat berpendar saat malam hari (*luminescent symptom*), sedangkan penelitian terhadap serangan infeksi virus terutama *white spot syndrome virus* (WSSV) yang merupakan penyebab kegagalan usaha pertambakan belum dilaporkan, terutama untuk mencari isolat lokal (*indigenous isolates*). Penelitian yang dilakukan juga lebih banyak pada stadium larva, yaitu periode saat masih di *hatchery* (Verschuere dkk. 2000; Geovanny dkk. 2007), padahal kegiatan budidaya udang di pertambakan pun membutuhkan perhatian yang sama.

Tujuan penelitian adalah untuk mengisolasi bakteri probiotik lokal potensial dari beberapa lokasi pembudidayaan udang vannamei dan melakukan seleksi berdasarkan kelangsungan hidup udang. Hasil penelitian ini diharapkan diperoleh kandidat bakteri probiotik lokal potensial yang dapat diseleksi lebih lanjut melalui uji efikasi terhadap WSSV, dan aman sebagai agen biologi untuk meningkatkan status kesehatan udang vannamei.

## **BAHAN DAN METODE**

### **BAHAN**

#### **Isolat bakteri**

Isolat-isolat bakteri diperoleh dari empat daerah pertambakan yaitu Serang, Tangerang, Pandeglang yang berada di provinsi Banten, dan Karawang yang berada di provinsi Jawa Barat. Pertimbangan menentukan empat daerah sampling terkait dengan keberadaan usaha pertambakan

udang penaeid terutama udang windu (*P. monodon*) dan udang vannamei (*L. vannamei*) di wilayah tersebut (Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya 2006).

### **Udang**

Udang yang digunakan selama percobaan adalah udang vannamei (*L. vannamei*) yang diperoleh dari *hatchery* udang komersial milik PT. Tri Windu Sakti Manunggal yang berada di daerah Anyer, Kabupaten Pandeglang. Udang tersebut berukuran *post larva* (PL)10 dan bebas penyakit WSSV (*specific pathogen free*; SPF WSSV) diuji melalui pengecekan dengan metode PCR.

### **Air Laut**

Air laut yang dipakai selama percobaan adalah air laut yang diperoleh dari Perairan Ancol (Jakarta Utara), diambil dari jarak 1000 m dari pantai pada kedalaman 2-3 m dari permukaan dengan salinitas air laut berkisar 25 ppt.

### **Media kultur dan bahan kimia**

Media dan bahan kimia yang digunakan adalah: *marine agar* (Difco 2216), TSB (*triptic soy broth*; Merck) untuk memperkaya isolat yang akan digores pada agar dalam *petridish*, NaCl (Merck), alkohol 70%, akuades,



*sodiumtiosulphate*, *bleech (liquid)*, dan beberapa bahan yang rutin dipakai di laboratorium mikrobiologi.

### **Peralatan**

Beberapa alat yang dipakai selama penelitian adalah: *laminar air flow cabinet* (Makita), *vortex* (Genie 2), *incubator* (Heraeus), *oven* (Heraeus), *autoklaf* (Hirayama), mikroskop (Olympus), mikro pipet (Eppendorf; 1000  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 10  $\mu$ L), mikro tip, mikrotube (Eppendorf 1,5 ml, 0,2 ml), *refrigerator* (samsung), *spectrophotometer* (Genesys 11), *refractometer* (Atago-90), pengukur kualitas air: DO, temperatur, pH (Hanna instrument model H19143); amonium *test kit* (Merck), nitrit *test kit* (Merck), amoniak *test kit* (Merck), nitrat *test kit* (Merck), termometer (*model pen-like manual*, skala 0,1° C), dan beberapa *glass ware* dan peralatan yang lazim digunakan di laboratorium mikrobiologi.

### **METODE**

#### **Sampling bahan isolasi (substrat) bakteri**

Stasiun sampling kandidat probiotik ditentukan secara acak, disesuaikan dengan kondisi lokasi di lapangan, yaitu 5-7 titik stasiun per petak tambak udang berukuran 3000-5000 m<sup>2</sup>. Sampel diambil pagi hari mulai pukul 8.00 WIB, saat cuaca cerah, dengan kondisi kualitas air: oksigen

terlarut (DO) 4-5 mg/l, salinitas: 25-29 ppt, pH air: 7,9-8,2, dan suhu air: 28-30° C.

Substrat diambil mengikuti prosedur Lightner (1996) serta FAO & NACA (1999) dari tiga substrat, yaitu: (1) air tambak udang vannamei (2) sedimen/tanah tambak udang yang sedang digunakan memelihara udang, dan (3) usus udang (*shrimp's gut*) (Holt dkk. 1994; Irianto 2003). Sampling dilakukan dari tanggal 19 hingga 22 Januari 2007. Sampel berupa air ( $\pm$  500 ml) dan sedimen (50-100 gram) diambil dari beberapa stasiun secara acak dan dimasukkan ke dalam kantong plastik atau *enfermeyer* steril. Sampel tersebut disimpan dalam *refrigerator* pada suhu 4° C. Sampel dari usus udang diambil dengan membawa 10 ekor udang per petak tambak ke laboratorium dalam keadaan hidup menggunakan pengangkutan sistem tertutup (Lightner 1996), yaitu menggunakan kantong plastik yang ditambahkan oksigen dengan perbandingan air dan oksigen 1:3.

### **Isolasi bakteri**

Sampel yang diperoleh, selanjutnya diambil sekitar 5% (w/v), kemudian diisolasi dan ditumbuhkan (*enrichment*) pada medium TSB (*triptic soy broth*; 40g/l) dengan menambahkan NaCl 2% dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30° C sebelum digores pada media agar (SOW 2005). Sampel dari substrat sedimen (5 g) terlebih dahulu dilarutkan menggunakan akuades steril (5%, w/v), sedangkan sampel dari usus udang, digunakan metode *destruktif*, yaitu mengeluarkan isi usus udang untuk dijadikan sampel

(*gut scraping*) (Lightner 1996). Sampel yang telah ditumbuhkan, selanjutnya digores pada medium *marine agar* (Difco, 2216; 55,1 g/l) dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30° C (Holt dkk. 1994). Koloni yang representatif dipilih berdasarkan seleksi *morphotype* (warna koloni, bentuk koloni, ukuran koloni, tepi koloni dan elevasi koloni), pewarnaan Gram, dan uji terhadap media ber-pH rendah. Isolat terpilih di kultur dalam media agar miring dengan metode yang sama (*streak method*) dan disimpan pada suhu 4-10° C (Robertson dkk. 1998). Kultur pada media agar miring dibuat menjadi tiga kelompok yaitu *original culture*, merupakan isolat awal, *stock culture* merupakan isolat cadangan dan *working culture* merupakan isolat yang dipakai setiap saat. Pembagian tersebut dimaksudkan agar kemurnian isolat tetap terjaga (Holt dkk. 1994; Lightner 1996).

#### **Pertumbuhan bakteri kandidat probiotik pada pH rendah**

Pengujian isolat bakteri yang telah diperoleh pada pH rendah dimaksudkan untuk mencari kandidat probiotik yang memiliki ketahanan dan mampu hidup pada media ber-pH rendah. Hal tersebut merujuk pada Feliatra dkk. (2004) yang menyatakan bahwa salah satu persyaratan probiotik bakteri adalah mampu hidup pada pH rendah, karena diharapkan mampu hidup dan berkembang biak di dalam usus udang.

Pengujian ini penting karena tahapan selanjutnya adalah uji efikasi terhadap patogen *white spot syndrome virus* (WSSV), sehingga indikator tingkat imunitas (perbaikan dari dalam udang itu sendiri) akan menjadi fokus

utama dalam percobaan selanjutnya. Menurut Verschuere dkk. (2000) dan Balcázar dkk. (2006), salah satu aktivitas dari bakteri probiotik adalah mampu meningkatkan respon imunitas biota yang diuji, bakteri tersebut akan memulainya dari dalam tubuhnya, salah satunya melalui kolonisasi pada saluran pencernaannya.

Prosedur pembuatan media ber-pH rendah merujuk metode Hjelm dkk. (2004). Larutan TSB ditambah NaCl 2% yang telah disterilkan, kemudian ditambahkan HCl hingga pH mencapai skala angka pH 2. Larutan tersebut kemudian diambil 3 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril. Isolat bakteri kandidat probiotik selanjutnya diambil sebanyak satu jarum ose dan disuspensikan ke dalam larutan pH 2 yang telah dibuat dan diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 30° C. Bakteri yang tumbuh dibedakan secara visual dengan melihat kekeruhan media kultur yang digunakan (Zafran dkk. 1997).

#### **Persiapan air laut untuk media pemeliharaan udang**

Air laut yang akan digunakan, terlebih dahulu disterilisasi, yaitu dengan menambahkan *chlorine* 100 mg/l kemudian diaerasi kuat selama 6 jam dan dinetralisasi dengan *natriumthiosulphate*, dengan dosis 50% dari dosis *chlorine* yang digunakan (Direktorat Jenderal Perikanan 1987).

### **Aklimatisasi udang sebelum digunakan dalam penelitian**

Udang yang diperoleh dari *hatchery*, diaklimatisasikan selama 1 minggu, di dalam bak fiber, dengan dimensi 2mx1,5mx0,9m yang diisi air laut yang telah didesinfeksi (klorinasi 100 mg/l selama 6 jam), salinitas 25 ppt dan dilengkapi dengan unit pengudaraan (*Hi-blow aerator* 100 watt) serta penutup terpal berwarna gelap untuk menjaga suhu air tetap stabil berkisar 29-31° C. Udang diberi pakan komersial berupa pellet (kandungan protein 48%) dengan cara ditebar. Dosis pakan yang diberikan adalah 2% dari berat total dengan frekuensi pemberian 4 kali per hari (Direktorat Jenderal Perikanan 1987).

### **Skrining isolat bakteri terhadap kelangsungan hidup udang vanamei**

#### **Evaluasi wadah percobaan**

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh dari penggunaan wadah percobaan berukuran kecil volume 2 liter terhadap kelangsungan hidup udang vannamei dibandingkan dengan wadah yang berukuran lebih besar sekitar 1000 liter sebagai kontrol. Udang vannamei stadium *post larva* (PL)10 dengan densitas 10 ekor per liter dicoba untuk mengetahui pengaruh perbedaan wadah yang digunakan. Pakan buatan berupa pellet digunakan selama penelitian dengan dosis 2% dari biomas per hari dengan frekuensi pemberian pakan sebanyak 4 kali per hari (Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya 2004). Penelitian dilakukan selama 21 hari dengan 3 kali percobaan (*batch*) dan 3 kali ulangan. Tingkat kelangsungan

hidup (*survival rate*) udang diamati sebagai indikator untuk menentukan keberhasilan penelitian tersebut.

### **Penentuan konsentrasi bakteri**

Penelitian ini dilakukan untuk menentukan konsentrasi bakteri kandidat probiotik yang akan digunakan. Bakteri *Vibrio harveyi* (Robertson dkk. 1998) yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara. Isolat yang diperoleh diremajakan (*sub culture*) pada media *marine agar* (2216 Difco; 55,1g/l). Selama penelitian, isolat tersebut ditumbuhkan pada media cair TSB (*tryptic soy broth*) (SOW 2005) dengan penambahan 2% NaCl dan selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30° C. Estimasi jumlah bakteri dilakukan dengan menggunakan *spectrophotometer* (Genesis 10x).

Udang stadia PL<sub>10</sub> dengan densitas 10 ekor per liter digunakan sebagai hewan uji selama penelitian dengan merendamnya selama 2 jam (Robertson dkk.1998) pada konsentrasi bakteri berturut-turut 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> dan 10<sup>7</sup> per ml. Air media selanjutnya diganti dengan air laut salinitas 25 ppt yang telah disterilkan menggunakan autoklaf. Penelitian tersebut dilakukan dengan tiga ulangan hingga diperoleh mortalitas udang 50% (LD<sub>50</sub>).

## Evaluasi kandidat bakteri probiotik terhadap kelangsungan hidup udang

Penelitian dilakukan dengan menggunakan rancangan acak lengkap dengan 3 ulangan. Seratus tiga puluh enam (136) isolat kandidat bakteri probiotik lokal hasil seleksi berdasarkan *morphotype* diuji terhadap udang vannamei dan membandingkannya dengan kontrol (tanpa penambahan kandidat probiotik). Udang stadium PL<sub>10</sub> dengan densitas 10 ekor per liter diuji menggunakan wadah volume 2 liter. Isolat kandidat probiotik diinokulasikan ke dalam media (air) dengan 10<sup>6</sup>/ml CFU. Pakan berupa pellet komersial diberikan 2% dari berat total dengan frekuensi 4 kali pemberian per hari. Kualitas air diamati setiap satu minggu sekali, sedangkan jumlah bakteri (*bacterial loading*) diamati pada awal penelitian dan akhir penelitian. Parameter tingkat kelangsungan hidup merupakan indikator untuk menentukan keberhasilan evaluasi tersebut.

### Analisis statistik

Data kelangsungan hidup udang pada wadah volume 2 liter, mortalitas udang pada konsentrasi *Vibrio harveyi* berbeda dan kelangsungan hidup udang dari isolat bakteri yang diuji, dianalisis dengan *analysis of variance* (*Anova*) dan dilanjutkan dengan uji pembandingan berganda *Dunnet* (kepercayaan 95%), jika terjadi perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ ). Data dianalisis dengan menggunakan program komputer SPSS versi 13,0.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Sampling bahan isolasi (substrat) dan isolasi kandidat bakteri probiotik

Isolat bakteri yang berhasil diisolasi dari empat daerah sampling berjumlah 168 isolat (Tabel I.1). Isolat bakteri tersebut terdiri dari 24 isolat (14,3%) berasal dari Serang, 46 isolat (27,4%) dari Tangerang, 55 isolat (32,7%) dari Karawang, dan 43 isolat (25,6%) dari Pandeglang. Sementara jika dilihat dari asal isolat (substrat) tersebut, maka terdapat 67 isolat (39,9%) diperoleh dari *air*, 49 isolat (29,1%) diperoleh dari sedimen dan 52 isolat (31,0%) dari usus udang (*shrimp's gut*).

**Tabel I.1** Isolat bakteri yang diperoleh dari empat daerah sampling

No	Substrat	Daerah sampling isolat				Jumlah
		Serang	Tangerang	Karawang	Pandeglang	
1	Air	10	17	18	22	67
2	Sedimen	6	14	18	11	49
3	Usus udang	8	15	19	10	52
<b>Total</b>		<b>24</b>	<b>46</b>	<b>55</b>	<b>43</b>	<b>168</b>

Berdasarkan data Tabel I.1, jumlah isolat bakteri yang berasal dari daerah sampling Serang lebih sedikit yaitu 24 isolat dibandingkan dengan tiga daerah sampling lainnya. Hal tersebut diduga terkait dengan kualitas lingkungan perairan di lokasi sampling. Sumber air pertambakan udang, di daerah tersebut berasal dari Teluk Banten yang merupakan tempat



bermuaranya sejumlah sungai. Salah satu sungai yang bermuara di teluk Banten adalah sungai Ciujung, sehingga diduga sisa buangnya berpengaruh terhadap keragaman biota termasuk mikroorganismenya (Groom dkk. 2006). Nilai *chemical oxygen demand* (COD) di sungai Ciujung yang merupakan salah satu indikator untuk menentukan kualitas lingkungan yang diukur tahun 2005 hingga 2007 berkisar antara 26-57 mg/l. Nilai tersebut telah melebihi ambang batas yang ditetapkan pemerintah berdasarkan PP nomor 21 tahun 2001 yaitu 10 mg/l (Achdiat dkk. 2007).

Dugaan selanjutnya adalah di sekitar Teluk Banten, yaitu daerah Bojonegara dan Cilegon merupakan pusat industri kimia. Kondisi seperti itu sangat berpengaruh terhadap kualitas air di teluk Banten seperti seperti peningkatan suhu air, penurunan pH air, dan penurunan oksigen terlarut. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Gatesoupe (1999) yang menyatakan bahwa keragaman mikroorganisme ditentukan oleh kualitas lingkungan ekosistemnya. Semakin baik kualitas ekosistemnya maka keragaman mikroorganisme akan lebih bervariasi dibandingkan dengan kualitas ekosistem yang buruk.

Isolat bakteri yang diperoleh, diambil dari tiga substrat, yaitu: air tambak udang vannamei, sedimen tambak dan usus udang (*shrimp gut*). Hal tersebut mengindikasikan bahwa isolat bakteri dapat tumbuh dalam air, sedimen dan usus udang, sesuai dengan pendapat Holt dkk. (1994) yang menyatakan bahwa bakteri, di antaranya genus *Bacillus* dan *Micrococcus* dapat tumbuh pada berbagai substrat termasuk air, sedimen/tanah dan usus

udang. Sementara Irianto (2003) dan Rengpipat dkk. (2000), menyatakan lebih spesifik yaitu bakteri probiotik dapat diisolasi dari media pemeliharaan ikan atau udang, sedimen/tanah dan saluran pencernaan (usus).

Tabel I.1 juga menunjukkan bahwa jumlah isolat yang diambil dari substrat air lebih banyak yaitu 67 isolat (39,9%) dibandingkan dengan sedimen dan usus yaitu: 49 isolat (29,1%) dan 52 isolat (31,0%) secara berturut-turut. Hal tersebut sangat memungkinkan karena air banyak mengandung zat-zat anorganik maupun organik, sehingga merupakan tempat yang baik bagi kehidupan mikroorganisme (Oginsky and Umbreit 1958). Mikroorganisme yang *autotrof* merupakan penghuni pertama di dalam air yang mengandung zat-zat non organik. Sel-sel yang mati merupakan bahan organik yang memungkinkan kehidupan bagi mikroorganisme *heterotrof*. Temperatur air juga turut menentukan populasi mikroorganisme dalam air. Pada umumnya temperatur air pertambakan berkisar antara 28 hingga 30° C, sangat baik bagi kehidupan bakteri (Verschuere dkk. 2000; Gatesoupe 1999).

Berdasarkan seleksi perbedaan *morphotype*, diperoleh 136 isolat (Tabel I.2) dari 168 isolat (Lampiran I.1 sampai I.18) bakteri yang akan diseleksi berdasarkan kelangsungan hidup udang vannamei. Terdapat 32 isolat (19,0%) yang memiliki karakteristik yang sama secara *morphotype*.

**Tabel I.2.** Hasil seleksi berdasarkan *morphotype* isolat bakteri dari empat daerah sampling

No	Bahan isolasi/ Substrat	Daerah sampling				Jumlah
		Serang	Tangerang	Karawang	Pandeglang	
1	air	7	11	17	17	52
2	sedimen	6	13	17	11	47
3	usus udang	5	12	13	7	37
Total		18	36	47	35	136

Adanya persamaan *morphotype* seperti warna koloni, bentuk koloni, tepi koloni dan elevasi koloni (Holt dkk. 1994; Irianto 2003) dari empat daerah sampling sangat dimungkinkan karena, semua isolat yang diperoleh diambil dari tiga substrat yang sama per daerah sampling yaitu air, sedimen dan usus udang (*shrimp's gut*) (Geovanny dkk. 2007). Dugaan lain adalah meskipun isolat bakteri tersebut diambil dari empat daerah berbeda, namun isolat bakteri tersebut diambil dari pertambakan udang vannamei yang memiliki kemiripan karakter fisika kimia yaitu: air berkadar garam/salinitas 20-30 ppt dan berada dekat daerah pesisir (*coastal area*) (Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya 2004).

#### **Pertumbuhan bakteri kandidat probiotik pada pH rendah**

Pengamatan pertumbuhan isolat bakteri kandidat probiotik menunjukkan bahwa terdapat 59 isolat (43,3%) dari 136 isolat yang mampu hidup pada pH rendah (pH 2,0) (Tabel I.3). Hal tersebut diindikasikan

dengan adanya perubahan warna (keruh) pada media pertumbuhan (TSB) dan tumbuhnya koloni bakteri setelah di-*plating* pada media agar.

**Tabel I.3.** Sebaran kandidat bakteri probiotik pada pH 2,0

No	Daerah asal isolat	Jumlah isolat	Jumlah isolat tumbuh pada pH 2,0
1	Serang	18	5
2	Tangerang	36	20
3	Karawang	47	15
4	Pandeglang	35	19
Total		136	59

Kemampuan sejumlah 59 isolat hidup pada pH 2 sangat penting untuk seleksi isolat sebagai kandidat probiotik, karena isolat-isolat tersebut diharapkan hidup dan aktif mengkolonisasi pada saluran pencernaan ikan/udang yang memiliki kisaran pH di bawah 4 (Rengpipat dkk. 2000; Verschuere dkk. 2000; Balcázar dkk. 2006). Hal tersebut merujuk pada Feliatra dkk. (2004) yang menyatakan bahwa isolat bakteri kandidat probiotik harus memiliki toleransi yang lebar terhadap pH rendah (pH 2,0).

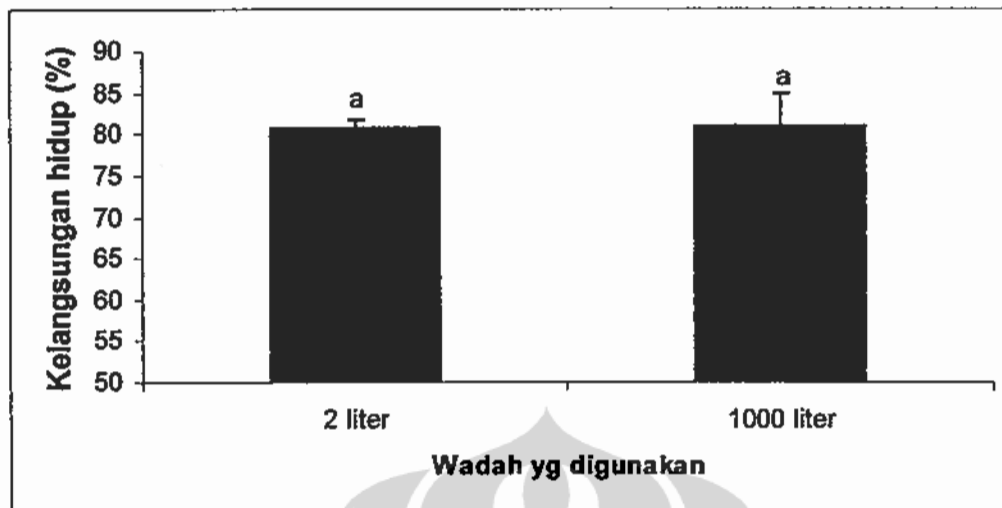
Isolat yang berasal dari daerah sampling Serang hanya sedikit yang mampu hidup pada pH 2,0 yaitu 5 isolat dibandingkan dengan daerah sampling lainnya yaitu 20, 15 dan 19 isolat untuk daerah Tangerang, Karawang dan Pandeglang secara berturut-turut. Hal tersebut mengindikasikan isolat yang diperoleh dari air dan sedimen dari Serang,

merupakan isolat bakteri yang tidak memiliki toleransi lebar pada derajat keasaman dari lingkungan hidupnya. Holt dkk. (2004) menyatakan bahwa tidak semua bakteri memiliki toleransi yang lebar terhadap beberapa parameter ekologi. <sup>Diantara</sup> Salah satu bakteri yang memiliki toleransi yang lebar adalah genus *Bacillus* dan *Micrococcus*. Genus *Bacillus* memiliki toleransi terhadap panas, pH dan salinitas, sedangkan genus *Micrococcus* memiliki toleransi yang lebar terhadap salinitas (*halotolerant*). Genus *Micrococcus* mampu hidup pada lingkungan dengan salinitas mencapai 50 gram/liter.

Selanjutnya dijelaskan oleh Feliatra dkk. (2004), bahwa dalam percobaannya, terdapat 9 spesies bakteri yang diambil dari lambung dan usus ikan kerapu yang memiliki ketahanan pada pH 2,0 dan berpotensi sebagai probiotik diantaranya: *Lactococcus* sp., *Carnobacterium* sp., *Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp., *Eubacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Lactobacillus* sp., *Micrococcus* sp., dan *Bifidobacterium* sp.

#### **Evaluasi viabilitas udang pada wadah yang digunakan untuk percobaan**

Hasil pengujian terhadap wadah volume 2 liter menunjukkan kelangsungan hidup yang tidak berbeda nyata ( $p > 0,05$ ) yaitu sebesar 80,75%, dibandingkan dengan kontrol (81%) yang menggunakan wadah volume 1000 liter sebagaimana terlihat pada Gambar 1.1 dan Lampiran 1.9.



**Gambar I.1.** Kelangsungan hidup udang vannamei pada volume wadah pemeliharaan yang berbeda.

Hasil ini mengindikasikan bahwa kelangsungan hidup udang tidak dipengaruhi oleh volume wadah penelitian. Kondisi tersebut, diduga karena densitas udang per unit area kedua wadah percobaan sama yaitu 10 ekor udang per liter, sehingga kedua perlakuan memiliki rasio pemanfaatan badan air (*water column*) yang sama pula. Kondisi serupa dinyatakan oleh Rodríguez dkk. (2007) yang melaporkan bahwa wadah penelitian dengan volume 2 liter tidak berpengaruh terhadap kelangsungan hidup udang yang diuji. Percobaan yang dilakukannya adalah skrining imunostimulan terhadap udang vannamei, yang menggunakan wadah bulat volume 2 liter dengan densitas udang ukuran *post larva* (PL) 20 ekor.

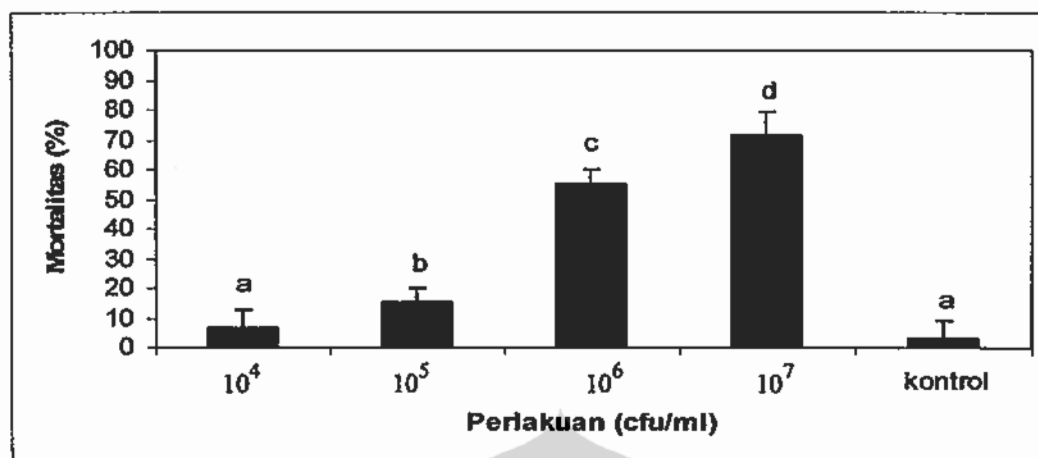
Faktor lain yang mendukung kelangsungan hidup udang pada volume wadah rendah adalah karakter udang vannamei yang mampu memanfaatkan kolom air, meskipun udang tersebut bersifat bentik (Robertson dkk. 1998),

sehingga volume wadah penelitian yang kecil tidak menjadi hambatan bagi udang untuk tetap hidup.

Kualitas air yang stabil dan cukup untuk kedua perlakuan wadah diduga juga menentukan keberhasilan penelitian. Kondisi kualitas air yang stabil seperti oksigen terlarut dan suhu yang relatif sama, yaitu DO 4-5 mg/l dan suhu air 29-30° C untuk kedua wadah membuat kelangsungan hidup tidak berbeda antar wadah percobaan (Boyd 1998).

### **Optimasi konsentrasi bakteri sebagai inokulum**

Hasil percobaan terhadap konsentrasi bakteri *Vibrio harveyi* menunjukkan bahwa peningkatan mortalitas udang berkaitan erat dengan meningkatnya konsentrasi bakteri (Gambar 1.2). Mortalitas  $\pm 50\%$  (LD<sub>50</sub>) dicapai setelah udang vannamei dipapar bakteri pada konsentrasi 10<sup>6</sup>/ml. Perhitungan statistik optimasi konsentrasi bakteri sebagai inokulum disajikan pada Lampiran 1.10.



**Gambar 1.2.** Mortalitas udang vannamei setelah dipaparkan pada beberapa konsentrasi *Vibrio harveyi* yang berbeda

Verschuere dkk. (2000), menyatakan bahwa keberhasilan probiotik selain ditentukan faktor *stochastic* yaitu kesempatan bakteri untuk masuk pada waktu dan tempat yang tepat ke dalam habitat yang cocok agar dapat hidup, juga dipengaruhi oleh faktor *deterministic* berkaitan dengan besaran dan respon yang ditimbulkannya, seperti dosis/konsentrasi bakteri, temperatur media pemeliharaan, konsentrasi oksigen, dan kuantitas dan kualitas pakan yang diberikan.

Model penelitian yang sama dilakukan oleh Robertson dkk. (1998). Dalam penelitiannya, konsentrasi yang dicapai untuk menentukan  $LD_{50}$  terhadap bakteri *Vibrio harveyi* adalah  $10^6/ml$  melalui perendaman selama 2 jam. Percobaan tersebut dilakukan pada udang windu (*Penaeus monodon*). Lebih lanjut dijelaskan oleh Robertson dkk. (1998) bahwa perendaman lebih dari 2 jam akan menimbulkan mortalitas yang lebih parah. Hal tersebut dimungkinkan karena bakteri *Vibrio harveyi* yang merupakan



bakteri patogen terhadap udang memiliki kesempatan lebih banyak untuk penetrasi ke usus udang sebagai target organnya. Berdasarkan kondisi tersebut, maka konsentrasi  $10^6$ /ml cukup untuk mengetahui efektifitas dari kandidat probiotik yang ditambahkan.

#### Evaluasi kandidat bakteri probiotik terhadap kelangsungan hidup udang

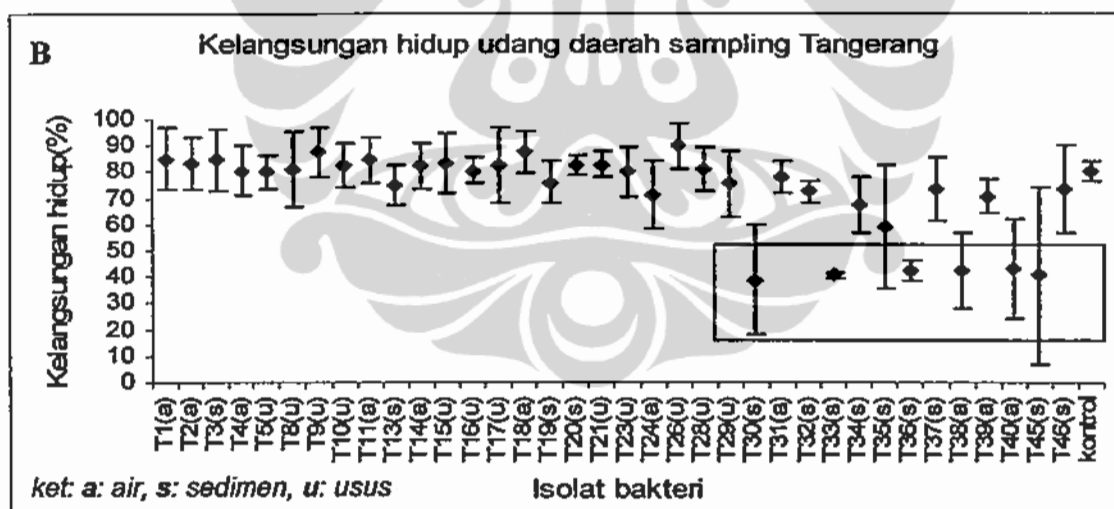
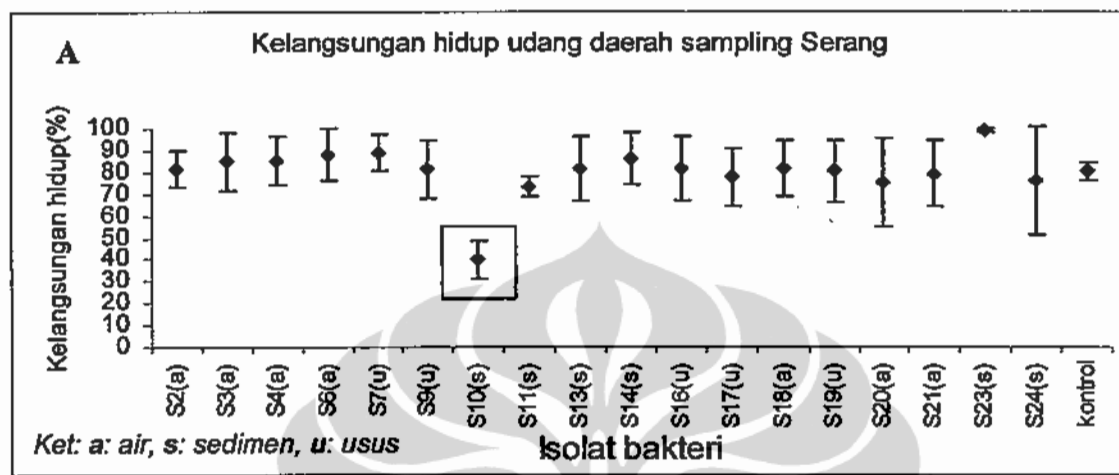
Hasil pengamatan terhadap kelangsungan hidup udang vannamei, menunjukkan bahwa dari 136 isolat, terdapat 71 isolat (52,2%) (Tabel I.4) yang mengindikasikan tingkat kelangsungan hidup sama atau lebih besar ( $p > 0,05$ ) dari kontrol (80,23%) (Lampiran I.11 – I.14).

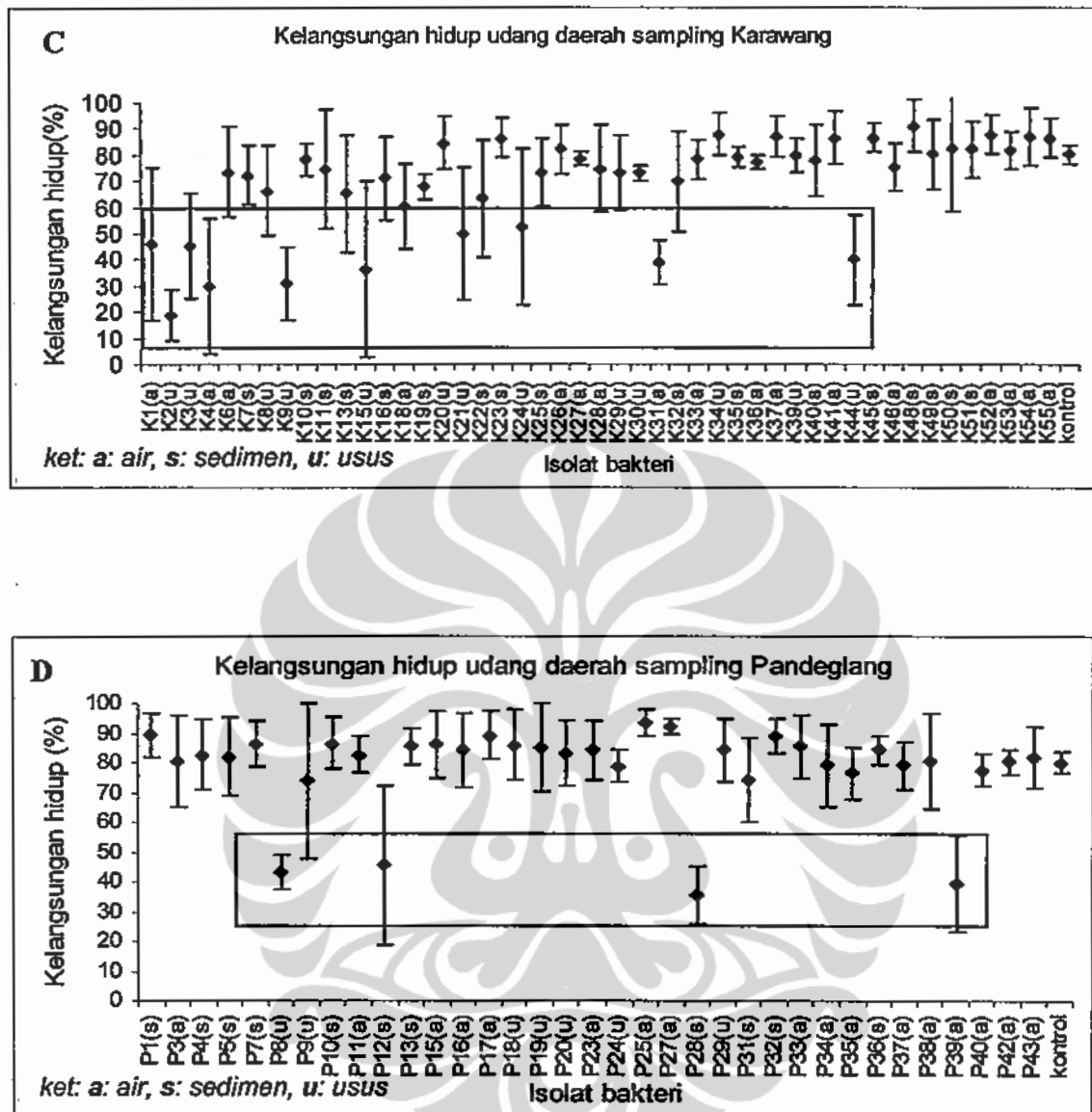
**Tabel I.4.** Jumlah kandidat isolat bakteri probiotik lokal hasil seleksi berdasarkan kelangsungan hidup udang vannamei

No	Bahan isolasi/ substrat	Daerah sampling				Jumlah
		Serang	Tangerang	Karawang	Pandeglang	
1	Air	5	6	7	12	30
2	Sedimen	3	2	6	8	19
3	Usus udang	4	11	3	4	22
Total		12	19	16	24	71

Kelangsungan hidup udang bervariasi dari empat daerah sampling yang ada (Gambar I.3). Isolat yang berasal dari daerah Serang relatif

seragam dibandingkan dengan kontrol, selanjutnya diikuti oleh isolat yang berasal dari daerah Tangerang, Pandeglang dan Karawang.





**Gambar 1.3.** Kelangsungan hidup udang vannamei setelah dipapar kandidat bakteri probiotik dari 4 daerah sampling. Isolat-isolat yang memiliki nilai lebih rendah dari kontrol (tanpa penambahan isolat bakteri) ditunjukkan di dalam kotak. A: daerah sampling Serang, B: daerah sampling Tangerang, C: daerah sampling Karawang, D: daerah sampling Pandeglang

Isolat bakteri yang berasal dari daerah Serang relatif tidak bervariasi, hanya satu isolat bakteri (5,5%) yaitu kode S<sub>10</sub> yang menunjukkan persentase

kelangsungan hidup sebesar 40%, berbeda dengan isolat-isolat bakteri lainnya. Isolat bakteri tersebut diperoleh dari substrat *sedimen* (s). Distribusi isolat-isolat bakteri lokal yang berasal dari daerah Tangerang juga relatif seragam. Terdapat 6 isolat bakteri (16,6%) yang menunjukkan kelangsungan hidup yang rendah yaitu  $\pm 40\%$ . Isolat-isolat tersebut berasal dari sedimen (s) dan air (a). Daerah Karawang, memiliki distribusi bervariasi dibandingkan dengan daerah Serang dan Tangerang. Terdapat 10 isolat (21,3%) menunjukkan nilai kelangsungan hidup udang yang rendah, yaitu berkisar 20-50%. Isolat-isolat tersebut terdistribusi dari air (a) dan usus udang (u). Sementara daerah Pandeglang relatif sama dengan daerah Tangerang. Terdapat 4 isolat bakteri (11,4%) menunjukkan nilai kelangsungan hidup udang yang rendah yaitu berkisar 35-45% dan terbagi merata pada semua bahan yang diambil sampelnya yaitu air (a), sedimen (s) dan usus udang (u).

Kandidat bakteri probiotik yang menunjukkan nilai kelangsungan hidup udang vannamei yang sama atau lebih besar ( $\geq$ ) dari kontrol, diduga karena bakteri tersebut hidup, tumbuh dan berfungsi sebagai probiotik (Verschuere dkk. 2000), sehingga dapat meningkatkan kelangsungan hidup udang vannamei. Bakteri tersebut tidak bersinergi negatif terhadap udang, seperti halnya *Vibrio harveyi* yang merupakan bakteri patogen pada udang penaeid (Rengpipat dkk. 2003). Peran yang mungkin terjadi dengan kemampuan bakteri kandidat probiotik bekerja pada organ dalam (membentuk koloni pada usus) diduga menyebabkan terjadinya kompetisi dengan bakteri lain

(patogen) dalam pelekatan pada usus udang (Feliatra dkk. 2004; Balcázar dkk. 2006).

Dugaan lainnya adalah kemampuan kandidat bakteri probiotik dalam memproduksi *bacteriocin* (Irianto & Austin 2002) sehingga bakteri yang bersifat patogen tidak dapat berkembang (Verschuere dkk. 2000; Vaseeharan and Ramasamy 2003). Selain itu kemampuan kandidat bakteri probiotik mengolonisasi usus memungkinkan bakteri tersebut membuat lingkungannya (usus) menjadi penghambat untuk mikroorganisme lainnya (seperti pH rendah), sehingga bakteri lain yang tidak tahan terhadap pH rendah tidak tumbuh (Ali 2000; Verschuere dkk. 2000; Farzanfar 2006). Kandidat bakteri probiotik juga diduga mampu meningkatkan imunitas udang, sehingga udang lebih tahan terhadap patogen atau kemungkinan perubahan lingkungan pada media pemeliharaannya (Rengpipat dkk. 2000; Alavandi dkk. 2004; Balcázar dkk. 2006).

Hasil penelitian di atas menunjukkan bahwa tidak semua bakteri bersinergi negatif terhadap udang, sesuai dengan pendapat Geovanny dkk. (2007) dan Balcázar dkk. (2006). Hal ini mengindikasikan bahwa isolat bakteri lokal dapat diseleksi lebih lanjut melalui uji efikasi terhadap agen patogen tertentu pada udang. Kondisi tersebut diperkuat oleh beberapa bukti hasil penelitian Rengpipat dkk. (2003) yang melaporkan bahwa *Vibrio* sp. yang diisolasi dari saluran pencernaan udang dan pakan alami dapat menekan bakteri patogen seperti *Vibrio harveyi*. Widanami (2004) juga melaporkan bahwa SKT-b, yaitu bakteri *Vibrio alginolyticus* yang diisolasi

dari *Skeletonema costatum* (disingkat SKT) dapat menekan pertumbuhan bakteri patogen setelah diuji dengan *Vibrio harveyi* yang merupakan bakteri patogen pada udang.

Rengpipat dkk. (1998, 2000 & 2003), juga melaporkan bahwa *Bacillus* S11 yang diisolasi dari induk (*broodstock*) udang windu juga terbukti dapat menstimulasi imunitas (aktifitas pagosit dan total hemosit) udang windu setelah diuji dengan *Vibrio harveyi*. Rengpipat dkk. (2000), melaporkan tingkat kelangsungan hidup udang windu mencapai 100% pada akhir masa pemeliharaan sedangkan kontrol (tanpa pemberian kandidat probiotik) hanya mencapai 26%. Demikian juga yang dilaporkan Maeda & Nogami 1989, (lihat Haryanti dkk. 1997), bahwa *Vibrio alginolyticus* yang digunakan dalam produksi benih di Ekuador terbukti dapat meningkatkan kelangsungan hidup dan pertumbuhan larva udang vannamei.

Perlakuan bakteri kandidat probiotik dari empat daerah sampling yang menghasilkan tingkat kelangsungan hidup lebih kecil dibandingkan dengan kontrol dan berbeda nyata secara statistik ( $p < 0,05$ ) diduga merupakan bakteri patogen pada udang. Bakteri tersebut kemungkinan dari salah satu genus *Vibrio* (Robertson dkk. 1998) karena hasil pengamatan menunjukkan bahwa salah satu bakteri tersebut memperlihatkan warna berpendar pada malam hari. Hal ini sesuai dengan yang dilaporkan Leano dkk. (1998) dan Gatesoupe dkk. (1999) serta Widanami (2004), bahwa *Vibrio harveyi* yang ditumbuhkan pada media non selektif seperti *marine agar* maupun *triptic soy*

*agar* (TSA) memperlihatkan warna *cream* dan terlihat berpendar pada malam hari.

Isolat-isolat bakteri lokal yang menunjukkan nilai kelangsungan hidup rendah dibandingkan dengan kontrol, banyak diperoleh dari daerah Karawang yaitu 10 isolat bakteri atau 21,3% diikuti daerah Tangerang 6 isolat (16,6%), daerah Pandeglang 4 isolat (11,4%) dan daerah Serang 1 isolat (5.5%). Kondisi tersebut diduga karena lokasi pertambakan yang diambil bahan isolasi/substratnya merupakan bekas daerah pertambakan udang windu (*Penaeus monodon*) eks proyek percontohan tambak udang pandu tambak inti rakyat (TIR) (Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya 2004). Kondisi demikian, sangat mungkin jika populasi dan keragaman jenis bakterinya pun lebih besar dan banyak dibandingkan ketiga daerah lainnya. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Gatesopue (1999) yang menyatakan bahwa keragaman dan sebaran bakteri dari pertambakan udang yang telah lama dioperasikan lebih tinggi dibandingkan dengan lahan yang relatif masih baru.

Hasil pengukuran jumlah populasi bakteri di dalam media pemeliharaan di akhir percobaan menunjukkan bahwa populasi bakteri kandidat probiotik berkisar  $10^7$ - $10^8$  /ml, sedangkan pada perlakuan kontrol hanya mencapai  $10^4$  /ml. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri kandidat probiotik yang ditambahkan ke dalam media pemeliharaan dapat tumbuh dan berkembang sesuai dengan yang diharapkan dalam media pemeliharaan udang. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Haryanti dkk. (1997) yang

melaporkan bahwa bakteri *Favimonas* kode (BY-9) dari daerah pesisir dengan konsentrasi  $10^5$ /ml dalam media pemeliharaan udang windu dapat tumbuh hingga  $10^6$ /ml pada akhir masa pemeliharaan larva udang windu. Muliani dkk. (2006), melaporkan bahwa bakteri *Psychrobacter* sp. hasil isolasi dari tambak yang diinjeksikan  $10^2$ /ml ke dalam media pemeliharaan dapat mencapai kepadatan  $10^6$ /ml pada percobaan skala lapangan (*in vivo*).

Kualitas air selama percobaan tidak menunjukkan perbedaan dari semua isolat yang diperiksa. Beberapa parameter yang diukur di antaranya: oksigen terlarut (DO) berkisar 4-5 mg/l, amoniak 0,1 mg/l, nitrit 0,1 mg/l, nitrat 2-3 mg/l dan temperatur 29,9-30,5° C. Kisaran tersebut masih aman untuk udang (Rengpipat dkk. 2000).

## KESIMPULAN

Hasil percobaan menunjukkan bahwa terdapat 71 isolat (52,2%) dari 136 isolat bakteri lokal yang potensial sebagai kandidat probiotik dalam kegiatan akuakultur. Isolat-isolat tersebut dapat dilanjutkan ke tahap seleksi berdasarkan kemampuan terapi pada udang vannamei terhadap WSSV dan uji pada trofik level lainnya dalam akuakultur (*Artemia*), dalam upaya meningkatkan kesehatan udang vannamei.



## DAFTAR ACUAN

- Achdiat, A., T. Wardoyo, A. Rivai, Susilo, A. H. Hariyanto, G. Daryono & A. Susastra, T. Herdiansyah, G. Elgawati, Maladi. 2007. DPD Perpamsi Banten. <http://www.Perpamsi.go.id>. Dikunjungi tanggal 20 November 2008.
- Alavandi, S. V., K.K. Vijayan, T. C. Santiago, M. Poomima, K. P. Jithendran, S.A. Ali & J.J.Rajan. 2004. Evaluation of *Pseudomonas* sp. PM11 and *Vibrio fluviales* PM17 on immune Indices of Tiger Shrimp, *Penaeus monodon*. [Abstrak] *Fish Shellfish Immunol.* 17:115–120.
- Ali, A. 2000. *The use of probiotic. In: fish farming. Evaluation of a bacteria mixture.* PhD Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences. Umea. Sweden. 213 hlm.
- Balcázar, J.L., I. De Blas, I. Ruiz-Zarzuola, D. Cunningham, D. Vendrell & J. L. Muzquiz. 2006. The role of probiotic in aquaculture. *Veterinary Microbiology.* 114:173-186.
- Boyd, C.E. 1998. *Water quality management for pond fish culture.* Elsevier. Alabama 318 hlm.
- Direktorat Jenderal Perikanan. 1987. *Petunjuk bagi pengoperasian unit usaha pembenihan (hatchery) udang windu.* Infis manual. 101 hlm.
- Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya. 2004. *Petunjuk teknis percontohan budidaya udang.* Departemen Kelautan dan Perikanan. 24 hlm.
- FAO & NACA (1999). *Diagnosis of shrimps disease, with emphasis on the black tiger shrimp (Penaeus monodon).* Multimedia Asia co ltd.
- Farzanfar, A. 2006. The use of probiotics in shrimp farming. Mini review. *FEMS immunolme microbial.* 48: 149-158.
- Feliatra, I. Efendi & E.Suryadi. 2004. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Probiotik dari Ikan Kerapu Macan (*Ephinephelus fuscoguttatus*) dalam Upaya Efisiensi Pakan Ikan. *Natur Indonesia.* 6(2):75-80.
- Gatesoupe, F.J. 1999. The use of probiotic in aquaculture: review. *Aquaculture.* 180: 147-165.

- Geovanny, G.R., B. J.Luis & M.A Shen. 2007. Probiotics as control agents in aquaculture. A review. *Journal of Ocean University of China*. 6(1):76-79.
- Gullian, M., F. Thompson & J. Rodriguez. 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their Immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. 233:1-14.
- Groom, M. J., G. K. Meffe & C. R. Caroll. 2006. *Principle of conservation biology*. Third Edition. Sinaauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. USA. 779 hlm.
- Haryanti, S., Lante & S. Tsumura. 1997. Studi pendahuluan penggunaan bakteri *Flavimonas* BY-9 sebagai probiotik dalam pemeliharaan larva udang windu (*Penaeus monodon*). *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*. 3:44-54.
- Hjelm, M., Ø. Bergh, A. Riaza, J. Nielse, J. Melchiorsen, S. Jensen, H. Duncan, P. Ahrens, H. Birkbeck & L. Gram. 2004. Selection and identification of autochthonous potential probiotic bacteria from Turbot Larvae (*Scophthalmus maximus*) rearing units. *System Appl. Microbial*. 27:360-371.
- Holt, J.G, N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, & S.T. William. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams and Wilkins, Ninth edition. Baltimore, Maryland, USA. 754 hlm.
- Irianto, A. & B. Austin. 2002. Probiotic in aquaculture. Review. *Journal of Fish Disease*. 25: 663-642.
- Irianto, A. 2003. *Probiotik akuakultur*. Gadjah Mada University Press. 125 hlm.
- Leano, E.M., R. Celia, Lavilla-Pitogo & G. Milagros. 1998. Bacterial flora in the hepatopancreas of pond-reared *Penaeus monodon* juveniles with luminous vibriosis. *Aquaculture*. 164: 367-374.
- Lightner, D.V. (Ed) (1996). *A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.
- Muliani, A. Suwanto, & Y. Hala. 2006. Penapisan bakteri yang diisolasi dari tambak udang windu (*Penaeus monodon* Fab). *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia. Edisi Akuakultur*. 2:16-21.

- Oginsky, E. L., & W. W. Umbreit. 1958. *An introduction to bacterial physiology*. Second edition. Toppan Company, Limited. Tokyo, Japan. 443 hlm.
- Rengpipat, S., W. Phianphak, S. Piyatiratitivorakul & P. Menasveta. 1998. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture*. **167**:301–313.
- Rengpipat, S., S. Rukpratanporn, S. Piyatiratitivorakul & P. Menasveta. 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fab.) by probiont bacterium (*Bacillus S11*). *Aquaculture*. **191**:271–288.
- Rengpipat, S., A. Tunyanun., A.W.Fast., S.Piyatiratitivorakul & P. Menasveta. 2003. Enhanced growth and resistance to *Vibrio* challenge in pond-reared black tiger shrimp *Penaeus monodon* fed a *Bacillus* probiotic. *Dis Aquat Org*. **55**:169-173.
- Robertson, P.A.W., J. Calderon, L. Carrera, J.R.Stark, M. Zherdmant & B. Austin. 1998. Experimental *Vibrio harveyi* infectious in *Penaeus vannamei* larvae. *Dis Aquat Org*. **32**:151-155.
- Rodríguez, J., Y. Espinosa, F. Echeverría, G. Cárdenas, R. Román, & S. Stern. 2007. Exposure to probiotics and  $\beta$ -1,3/1,6-glucans in larviculture modifies the immune response of *Penaeus vannamei* juveniles and both the survival to white spot syndrome virus challenge and pond culture. *Aquaculture*. **273**:405-415.
- SOW. N.M., R.D.Dauphin, D. Roblain, A. T. Huiro & P. Thonart. 2005. Polyphasic identification of a new thermotolerant species of lactic acid bacteria isolated from chicken faeces. *African Journal of Biotechnology*. **4**(5):409-421.
- Verschuere, L., G. Robaut, P. Sorgeloos & W. Verstraete. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **64**(4):655-671.
- Vaseeharan, B. & P. Ramasamy., 2003. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Lett. Appl. Microbiol*. **36**, 83–87.
- Widanami. 2004. *Penapisan bakteri probiotik untuk biokontrol Vibriosis pada larva udang windu: konstruksi penanda molekuler dan esei pelekatan*. Disertasi. Institut Pertanian Bogor. 74 hlm.

Zafran, D. Roza & I. Koesharyani. 1997. Resistensi isolat *Vibrio* dari beberapa panti benih udang windu (*Penaeus monodon* Fab) terhadap antibiotik. *Jurnal penelitian Perikanan Indonesia*. 3:11-14.





Lampiran I.1. Isolat bakteri hasil isolasi awal yang diperoleh dari Daerah Serang-Banten

No	Kode Isolat	Morfologi koloni	Kode Toples	Asal isolat	Warna isolat	Bentuk sel	Motilitas	Gram stain	pH 2
1	SRG/BV/CBS/AJ.19	KN/SD/BL/RT	S1	Air	kuning	Bulat	Motil	neg	tidak
2	SRG/TP/CBS/AJ.19	HJ/BS/BL/RT	S2	Air	hijau	Bulat	Nonmotil	neg	tidak
3	SRG/BV/CBS/AJ.19	KN/BS/BL/RT	S3	Air	kuning	Bulat	nonmotil	neg	tidak
4	SRG/TP/CBS/AJ.19	KN/KC/BL/RT	S4	Air	kuning	Bulat	Motil	neg	ya
5	SRG/TP/MA/AJ.19	PK/KC/BL/RT	S6	Air	pink	Bulat	Motil	pos	tidak
6	SRG/TP/MA/AJ.19	KN/KC/BL/RT	S8	Air	kuning	Bulat	Motil	neg	tidak
7	SRG/TP/MA/AJ.19	MR/SD/BL/RT	S18	Air	putih	Batang	tidakmotil	pos	tidak
8	SRG/TP/MA/AJ.19	CR-MD/SD/BL/RT	S20	Air	cream-muda	Batang	Nonmotil	neg	tidak
9	SRG/TP/MA/AJ.19	CR/KC/BL/RT	S21	Air	cream	Bulat	Motil	neg	ya
10	SRG/TP/MA/AJ.19	CR/BS/BL/RT	S22	Air	cream	Bulat	Motil	neg	tidak
11	SRG/TP/MA/UJ.19	CR/SD/BL/RT	S5	Usus	cream	Bulat	Motil	neg	ya
12	SRG/TP/MA/UJ.19	PU/SD/BL/RT	S7	Usus	putih	Bulat	Motil	neg	tidak
13	SRG/TP/MA/UJ.19	CR/KC/BL/RT	S9	Usus	cream	Batang	Nonmotil	pos	ya
14	SRG/TP/MA/UJ.19	CR/BS/BL/RT	S12	Usus	cream	Bulat	Motil	neg	tidak
15	SRG/BV/MA/UJ.19	CR/SD/BL/RT	S15	Usus	cream	Bulat	Motil	neg	tidak
16	SRG/BV/MA/UJ.19	CK-MD/BS/BL/RT	S16	Usus	coklat-muda	Bulat	Motil	neg	ya
17	SRG/BV/MA/UJ.19	CR-TP/KC/BL/RT	S17	Usus	cream-transparan	Batang	Motil	pos	tidak
18	SRG/BV/MA/UJ.19	CR/KC/BL/RT	S19	Usus	cream	Batang	Motil	neg	tidak
19	SRG/TL/MA/TJ.19	CR/BS/BL/RT	S10	Sedimen	cream	Bulat	Motil	neg	tidak
20	SRG/TL/MA/TJ.19	KN/KC/BL/RT	S11	Sedimen	kuning	Batang	Motil	neg	ya
21	SRG/TL/MA/TJ.19	KN-TA/BS/BL/RT	S13	Sedimen	kuning-tua	Bulat	Nonmotil	neg	tidak
22	SRG/TL/MA/TJ.19	CR/KC/BL/RT	S14	Sedimen	cream	Bulat	Motil	pos	tidak
23	SRG/TL/MA/TJ.19	OR/BS/BL/RT	S23	Sedimen	orange	Batang	Nonmotil	neg	tidak
24	SRG/TP/MA/TJ.19	PK/SD/BL/RT	S24	Sedimen	pink	Bulat	Nonmotil	neg	tidak

Keterangan:  
neg : negatif  
pos : positif

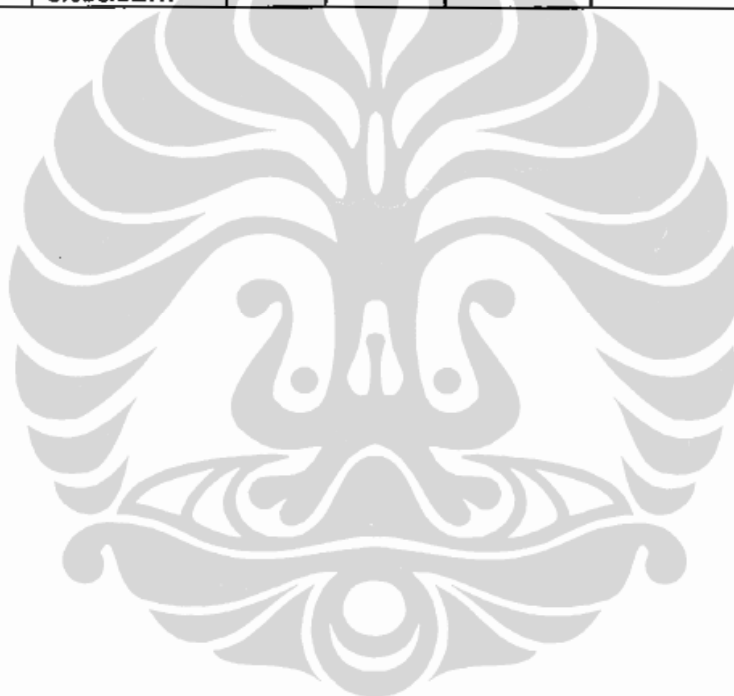
Lampiran I.2. Isolat bakteri hasil isolasi awal yang diperoleh dari Daerah Tangerang-Banten

No	Kode isolat	Morfologi	Kode Toples	Asal isolat	Warna isolat	Bentuk sel	Motilitas	Gram stain	pH 2
1	TGR/TK/MA/A/J.22	CR/BS/BL/RT	T1	air	cream	Batang	Motil	pos	tidak
2	TGR/TK/MA/A/J.22	KN/KC/BL/RT	T2	air	kuning	Bulat	tidakmotil	neg	ya
3	TGR/TK/MA/A/J.22	KN/BS/BL/RT	T4	air	kuning	Bulat	Motil	pos	ya
4	TGR/TK/MA/A/J.22	CR/SD/BL/RT	T7	air	cream	Bulat	Nonmotil	neg	ya
5	TGR/TK/MA/A/J.22	CK/BS/BL/RT	T11	air	coklat	Bulat	Motil	pos	ya
6	TGR/TK/MA/A/J.22	OR/BS/BL/RT	T12	air	orange	Bulat	Nonmotil	neg	ya
7	TGR/TK/MA/A/J.22	CR/KC/BL/RT	T14	air	cream	Bulat	Motil	neg	tidak
8	TGR/TK/MA/A/J.22	ORG/KC/BL/RT	T18	air	orange	Batang	Nonmotil	neg	ya
9	TGR/TK/MA/A/J.22	CK/KC/BL/RT	T24	air	coklat	Batang	Motil	pos	tidak
10	TGR/TK/TCBS/A/J.22	KN/BS/BL/RT	T25	air	kuning	Bulat	Nonmotil	neg	tidak
11	TGR/TJ/MA/A/J.22	KN/KC/BL/TR	T31	air	kuning	<i>Staphylococcus</i>	Nonmotil	pos	ya
12	TGR/TJ/MA/A/J.22	ORG/BS/BL/RT	T38	air	orange	Bulat	Motil	neg	tidak
13	TGR/TJ/MA/A/J.22	CK/KC/BL/RT	T39	air	coklat	Bulat	Motil	neg	ya
14	TGR/TJ/MA/A/J.22	CR/BS/BL/RT	T40	air	cream	Bulat	Nonmotil	pos	tidak
15	TGR/TJ/MA/A/J.22	CK/BS/BL/RT	T41	air	coklat	Batang	Motil	pos	ya
16	TGR/TJ/MA/A/J.22	CR/KC/BL/RT	T42	air	cream	Bulat	Nonmotil	pos	ya
17	TGR/TJ/MA/A/J.22	CR/BS/BL/RT	T43	air	cream	Bulat	Nonmotil	pos	tidak
18	TGR/TK/MA/U/J.22	KN/BS/BL/RT	T5	usus	kuning	<i>Diplococcus</i>	Motil	neg	tidak
19	TGR/TK/MA/U/J.22	CR/SD/BL/RT	T6	usus	cream	Bulat	Motil	neg	tidak
20	TGR/TK/MA/U/J.22	PK/KC/BL/RT	T8	usus	pink	Bulat	Nonmotil	neg	ya
21	TGR/TK/MA/U/J.22	CR/BS/BL/RT	T9	usus	cream	Batang	Motil	neg	ya
22	TGR/TK/MA/U/J.22	KN/KC/BL/RT	T10	usus	kuning	Bulat	Nonmotil	pos	ya
23	TGR/TK/MA/U/J.22	CR/KC/BL/RT	T15	usus	cream	<i>Srteptococcus</i>	Nonmotil	neg	tidak
24	TGR/TK/MA/U/J.22	PK/BS/BL/RT	T16	usus	pink	Bulat	Motil	pos	ya
25	TGR/TK/MA/U/J.22	ORG/SD/BL/RT	T17	usus	orange	Batang	Motil	pos	ya
26	TGR/TK/MA/U/J.22	KN/SD/BL/RT	T21	usus	kuning-tua	Batang	Motil	pos	ya
27	TGR/TK/MA/U/J.22	KN/KC/BL/RT	T22	usus	kuning	Bulat	Motil	neg	ya
28	TGR/TK/MA/U/J.22	KN-TU/BS/BL/RT	T23	usus	kuning-tua	Bulat	Motil	neg	ya
29	TGR/TJ/MA/U/J.22	KN/BS/BL/RT	T26	usus	kuning	Batang	Motil	pos	ya
30	TGR/TJ/MA/U/J.22	ORG/BS/BL/RT	T27	usus	orange	Batang	Motil	pos	ya
31	TGR/TJ/MA/U/J.22	CR/KC/BL/RT	T28	usus	cream	Batang	Nonmotil	pos	ya
32	TGR/TJ/MA/U/J.22	CR/BS/BL/RT	T29	usus	cream	Bulat	Nonmotil	neg	ya
33	TGR/TK/MA/T/J.22	KN/KC/BL/RT	T3	Sedimen	kuning	Bulat	Motil	pos	tidak
34	TGR/TK/MA/T/J.22	CR/KC/BL/RT	T13	Sedimen	cream	Bulat	Nonmotil	pos	ya
35	TGR/TK/MA/T/J.22	ORG/KC/BL/RT	T19	Sedimen	orange	Bulat	Motil	pos	tidak
36	TGR/TK/MA/T/J.22	CK/BS/BL/TR	T20	Sedimen	coklat	Batang	Motil	pos	tidak
37	TGR/TJ/TCBS/T/J.22	HJ/BS/BL/RT	T30	Sedimen	hijau	Bulat	Nonmotil	neg	tidak
38	TGR/TJ/MA/T/J.22	CK/KC/BL/RT	T32	Sedimen	coklat	Bulat	Nonmotil	neg	tidak
39	TGR/TJ/MA/T/J.22	CK/BS/BL/RT	T33	Sedimen	coklat	Bulat	Nonmotil	pos	tidak
40	TGR/TJ/MA/T/J.22	KN/KC/BL/RT	T34	Sedimen	kuning	Batang	Motil	neg	ya

Lampiran I.2. Isolat bakteri hasil isolasi awal yang diperoleh dari Daerah Tangerang-Banten (lanjutan)

No	Kode isolat	Morfologi	Kode Toples	Asal isolat	Warna isolat	Bentuk sel	Motilitas	Gram stain	pH 2
40	TGR/TJ/MA/T/J.22	KN/KC/BL/RT	T34	Sedimen	kuning	Batang	Motil	neg	ya
41	TGR/TJ/MA/T/J.22	ORG/BS/BL/RT	T35	Sedimen	orange	Bulat	Nonmotil	pos	ya
42	TGR/TJ/MA/T/J.22	CK/BS/BL/TR	T36	Sedimen	coklat	Batang	Motil	pos	ya
43	TGR/TJ/MA/T/J.22	KN/BS/BL/RT	T37	Sedimen	kuning	Bulat	Motil	neg	tidak
44	TGR/TJ/MA/T/J.22	ORG/KC/BL/RT	T44	Sedimen	orange	Bulat	Motil	pos	ya
45	TGR/TJ/MA/T/J.22	PK/BS/BL/RT	T45	Sedimen	pink	Bulat	Motil	pos	tidak
46	TGR/TJ/MA/T/J.22	CK/BS/BL/RT	T46	Sedimen	coklat	Bulat	Motil	pos	tidak

Keterangan:  
neg : negatif  
pos : positif





Lampiran I.3. Isolat bakteri hasil isolasi awal yang diperoleh dari Daerah Karawang-Jawa Barat

No	Kode Isolat	Morfologi	Kode Toples	Asal Isolat	Warna	Bentuk sel	Motilitas	Gram stain	pH 2
1	KRW/TIR2/MA/AJ.26	ORG/BS/BL/RT	K1	air	orange	Bulat	Motilitas	pos	ya
2	KRW/TIR2/MA/AJ.26	CR/BS/BL/RT	K4	air	cream	Bulat	Motilitas	neg	ya
3	KRW/TIR2/MA/AJ.26	CR/KC/BL/RT	K5	air	cream	Bulat	Motilitas	neg	ya
4	KRW/TIR2/MA/AJ.26	KN/BS/BL/RT	K6	air	kuning	Bulat	Motilitas	neg	tidak
5	KRW/TIR1/MA/AJ.26	CR/KC/BL/RT	K18	air	cream	Staphylococcus	Motil	pos	tidak
6	KRW/TIR1/MA/AJ.26	ORG/KC/BL/RT	K26	air	orange	Bulat	Nonmotil	pos	tidak
7	KRW/TIR1/MA/AJ.26	KN/KC/BL/RT	K27	air	kuning	Staphylococcus	Nonmotil	neg	ya
8	KRW/TIR1/MA/AJ.26	ORG/BS/BL/RT	K28	air	orange	Diplococcus	Nonmotil	neg	tidak
9	KRW/TIR1/MA/AJ.26	CR/BS/BL/RT	K31	air	cream	Bulat	Motilitas	neg	tidak
10	KRW/TIR1/MA/AJ.26	KN/BS/BL/RT	K33	air	kuning	Bulat	Nonmotil	neg	tidak
11	KRW/TIR3/MA/AJ.26	ORG/BS/BL/RT	K36	air	orange	Batang	Nonmotil	pos	tidak
12	KRW/TIR3/MA/AJ.26	CR/BS/BL/RT	K37	air	cream	Bulat	Nonmotil	neg	tidak
13	KRW/TIR3/MA/AJ.26	KN/BS/BL/RT	K41	air	kuning	Streptococcus	Nonmotil	pos	tidak
14	KRW/TIR3/MA/AJ.26	CR/KC/BL/RT	K46	air	cream	Batang	Motil	neg	tidak
15	KRW/TIR3/MA/AJ.26	ORG/KC/BL/RT	K52	air	orange	Batang	Nonmotil	neg	tidak
16	KRW/TIR3/MA/AJ.26	KN/BS/BL/RT	K53	air	kuning	Diplococcus	Motil	neg	ya
17	KRW/TIR3/MA/AJ.26	KN/KC/BL/RT	K54	air	kuning	Streptobasil	Nonmotil	neg	tidak
18	KRW/TIR3/MA/AJ.26	ORG/KC/BL/RT	K55	air	orange	Bulat	Motilitas	pos	ya
19	KRW/TIR2/TCBS/UJ.26	KN/BS/BL/RT	K2	usus	kuning	Bulat	Motilitas	neg	tidak
20	KRW/TIR2/TCBS/UJ.26	HJ/BS/BL/RT	K3	usus	hijau	Staphylococcus	Motil	neg	ya
21	KRW/TIR2/MA/UJ.26	ORG/KC/BL/RT	K8	usus	orange	Bulat	Nonmotil	neg	tidak
22	KRW/TIR2/MA/UJ.26	KN/KC/BL/RT	K9	usus	kuning	Bulat	Motilitas	pos	tidak
23	KRW/TIR2/MA/UJ.26	KN/BS/BL/RT	K14	usus	kuning	Bulat	Motilitas	neg	tidak
24	KRW/TIR2/MA/UJ.26	CR/KC/BL/RT	K15	usus	cream	Bulat	Nonmotil	pos	ya
25	KRW/TIR1/MA/UJ.26	ORG/BS/BL/RT	K17	usus	orange	Bulat	Nonmotil	neg	tidak
26	KRW/TIR1/MA/UJ.26	CR/KC/BL/RT	K20	usus	cream	Bulat	Motilitas	neg	tidak
27	KRW/TIR1/MA/UJ.26	CR/BS/BL/RT	K21	usus	cream	Bulat	Motilitas	pos	tidak
28	KRW/TIR1/MA/UJ.26	ORG/KC/BL/RT	K24	usus	orange	Diplococcus	Motil	pos	tidak
29	KRW/TIR1/TCBS/UJ.26	HJ/BS/BL/RT	K29	usus	hijau	Bulat	Motilitas	neg	tidak
30	KRW/TIR1/TCBS/UJ.26	KN/BS/BL/RT	K30	usus	kuning	Bulat	Nonmotil	neg	tidak
31	KRW/TIR3/MA/UJ.26	CR/KC/BL/RT	K34	usus	cream	Bulat	Motilitas	pos	tidak
32	KRW/TIR3/MA/UJ.26	CR/SD/BL/RT	K38	usus	cream	Bulat	Motilitas	neg	tidak
33	KRW/TIR3/MA/UJ.26	ORG/KC/BL/RT	K39	usus	orange	Cocobatang	Nonmotil	neg	tidak
34	KRW/TIR3/TCBS/UJ.26	KN/BS/BL/RT	K42	usus	kuning	Bulat	Motilitas	neg	tidak
35	KRW/TIR3/TCBS/UJ.26	HJ/BS/BL/RT	K43	usus	hijau	Bulat	Motilitas	neg	tidak
36	KRW/TIR3/TCBS/UJ.26	HJ/KC/BL/RT	K44	usus	hijau	Batang	Nonmotil	neg	tidak
37	KRW/TIR3/MA/UJ.26	CR/BS/BL/RT	K47	usus	cream	Bulat	Motilitas	neg	tidak
38	KRW/TIR2/MA/TJ.26	PK/KC/BL/RT	K7	Sedimen	pink	Bulat	Motilitas	neg	tidak
39	KRW/TIR2/MA/TJ.26	KN/BS/BL/RT	K10	Sedimen	kuning	Staphylococcus	Nonmotil	neg	ya
40	KRW/TIR2/MA/TJ.26	ORG/KC/BL/RT	K11	Sedimen	orange	Batang	Motil	neg	ya
41	KRW/TIR2/MA/TJ.26	KN/KC/BL/RT	K12	Sedimen	kuning	Bulat	Motilitas	pos	tidak
42	KRW/TIR2/MA/TJ.26	CR/KC/BL/RT	K13	Sedimen	cream	Streptococcus	Nonmotil	pos	ya
43	KRW/TIR2/MA/TJ.26	CR/BS/BL/RT	K16	Sedimen	cream	Bulat	Nonmotil	pos	tidak
44	KRW/TIR1/MA/TJ.26	CR/KC/BL/RT	K19	Sedimen	cream	Bulat	Motilitas	pos	tidak

Lampiran I.3. Isolat bakteri hasil isolasi awal yang diperoleh dari Daerah Karawang-Jawa Barat (lanjutan)

No	Kode isolat	Morfologi	Kode Toples	Asal isolat	Warna	Bentuk sel	Motilitas	Gram stain	pH 2
45	KRW/TIR1/MA/T/J.26	CR/BS/BL/RT	K22	Sedimen	cream	<i>Staphylococcus</i>	Nonmotil	pos	ya
46	KRW/TIR1/MA/T/J.26	ORG/BS/BL/RT	K23	Sedimen	orange	Bulat	Motilitas	pos	ya
47	KRW/TIR1/MA/T/J.26	ORG/KC/BL/RT	K25	Sedimen	orange	Bulat	Motilitas	neg	idak
48	KRW/TIR1/MA/T/J.26	KN/KC/BL/RT	K32	Sedimen	kuning	Bulat	Motilitas	neg	idak
49	KRW/TIR3/MA/T/J.26	KN/KC/BL/RT	K35	Sedimen	kuning	Batang	Motil	neg	ya
50	KRW/TIR3/MA/T/J.26	KN/SD/BL/RT	K40	Sedimen	kuning	Bulat	Nonmotil	neg	idak
51	KRW/TIR3/MA/T/J.26	KN/BS/BL/RT	K45	Sedimen	kuning	Bulat	Motilitas	pos	idak
52	KRW/TIR3/MA/T/J.26	CR/KC/BL/RT	K48	Sedimen	cream	Batang	Nonmotil	neg	ya
53	KRW/TIR3/MA/T/J.26	CR/BS/BL/RT	K49	Sedimen	cream	Bulat	Nonmotil	neg	ya
54	KRW/TIR3/MA/T/J.26	ORG/BS/BL/RT	K50	Sedimen	orange	Batang	Motil	pos	idak
55	KRW/TIR3/MA/T/J.26	ORG/KC/BL/RT	K51	Sedimen	orange	Batang	Nonmotil	pos	idak

Keterangan:  
neg : negatif  
pos : positif



Lampiran I.4. Isolat bakteri hasil isolasi awal yang diperoleh dari daerah Pandeglang Banten

No	Kode isolat	Morfologi koloni	Kode Toples	Asal isolat	Warna isolat	Bentuk sel	Motilitas	Gram stain	pH 2
1	PNB/TB/TCBS/AJ.29	KN/BS/BL/RT	P2	air	kuning	Bulat	Nonmotil	neg	ya
2	PNB/TB/MA/AJ.29	PK/KC/BL/RT	P3	air	pink	Batang	Nonmotil	pos	ya
3	PNB/TB/MA/AJ.29	CR-TP/BS/BL/RT	P11	air	cream-transparan	Batang	Motil	pos	tidak
4	PNB/TB/MA/AJ.29	KN/BS/BL/RT	P14	air	kuning	Bulat	Nonmotil	neg	tidak
5	PNB/TB/MA/AJ.29	CR/SD/BL/RT	P15	air	cream	<i>Srteptococcus</i>	Motil	neg	ya
6	PNB/TB/MA/AJ.29	CR-TP/BS/BL/TR	P16	air	cream	Batang	Motil	pos	tidak
7	PNB/TB/TCBS/AJ.29	HJ/SD/BL/RT	P17	air	hijau	Bulat	Nonmotil	neg	tidak
8	PNB/TB/TCBS/AJ.29	HJ/KC/BL/RT	P23	air	hijau	Bulat	Nonmotil	neg	tidak
9	PNB/TB/TCBS/AJ.29	KN/KC/BL/RT	P25	air	kuning	Bulat	Nonmotil	neg	ya
10	PNB/TB/TCBS/AJ.29	KN/SD/BL/RT	P26	air	kuning	Bulat	Nonmotil	neg	ya
11	PNB/TB/MA/AJ.29	KN/KC/BL/RT	P27	air	kuning	Bulat	Motil	pos	tidak
12	PNB/TB/MA/AJ.29	CR/KC/BL/TR	P30	air	cream	<i>Srteptococcus</i>	Motil	neg	ya
13	PNB/TB/MA/AJ.29	CR/SD/BL/TR	P33	air	cream	Bulat	Motil	pos	tidak
14	PNB/TB/MA/AJ.29	KN/BS/BL/RT	P34	air	kuning	Bulat	Motil	neg	ya
15	PNB/TB/MA/AJ.29	ORG/BS/BL/RT	P35	air	orange	<i>coccobasil</i>	Motil	pos	ya
16	PNB/TB/MA/AJ.29	CR/BS/BL/RT	P37	air	cream	Bulat	Nonmotil	neg	tidak
17	PNB/TB/MA/AJ.29	CR-TP/KC/BL/RT	P38	air	cream-transparan	Bulat	Nonmotil	pos	tidak
18	PNB/TB/MA/AJ.29	CR-TP/BS/BL/RT	P39	air	cream-transparan	Bulat	Motil	neg	ya
19	PNB/TB/MA/AJ.29	KN/SD/BL/RT	P40	air	kuning	Bulat	Nonmotil	pos	tidak
20	PNB/TB/MA/AJ.29	CR/BS/BL/TR	P41	air	cream	Bulat	Motil	pos	tidak
21	PNB/TB/MA/AJ.29	CR/BS/BL/RT	P42	air	cream	<i>Staphylococcus</i>	Nonmotil	pos	ya
22	PNB/TB/MA/AJ.29	CR/KC/BL/RT	P43	air	cream	Batang	Motil	pos	ya
23	PNB/TB/MA/UJ.29	CR/BS/BL/RT	P6	usus	cream	Bulat	Motil	neg	ya
24	PNB/TB/MA/UJ.29	PK/KC/BL/RT	P8	usus	pink	Bulat	Nonmotil	neg	ya
25	PNB/TB/MA/UJ.29	CR/KC/BL/RT	P9	usus	cream	Bulat	Nonmotil	neg	ya
26	PNB/TB/MA/UJ.29	KN/SD/BL/RT	P18	usus	kuning	Batang	Nonmotil	pos	tidak
27	PNB/TB/TCBS/UJ.29	HJ/BS/BL/RT	P19	usus	hijau	Bulat	Nonmotil	neg	tidak
28	PNB/TB/TCBS/UJ.29	KN/BS/BL/RT	P20	usus	kuning	Bulat	Nonmotil	neg	ya
29	PNB/TB/TCBS/UJ.29	KN/BS/BL/TR	P21	usus	kuning	Bulat	Motil	neg	ya
30	PNB/TB/TCBS/UJ.29	HJ/BS/BL/RT	P22	usus	hijau	Bulat	Nonmotil	neg	ya
31	PNB/TB/TCBS/UJ.29	KN/KC/BL/RT	P24	usus	kuning	Bulat	Motil	pos	tidak
32	PNB/TB/MA/UJ.29	CR/KC/BL/RT	P29	usus	cream	Bulat	Motil	neg	tidak
33	PNB/TB/MA/TJ.29	KN/BS/BL/RT	P1	Sedimen	kuning	Bulat	Motil	pos	ya
34	PNB/TB/MA/TJ.29	CR/KC/BL/RT	P4	Sedimen	cream	<i>Srteptobasil</i>	Motil	pos	tidak
35	PNB/TB/MA/TJ.29	KN-TU/BS/BL/RT	P5	Sedimen	kuning-tua	Bulat	Motil	neg	ya
36	PNB/TB/MA/TJ.29	PK/BS/BL/RT	P7	Sedimen	pink	Batang	Motil	pos	ya
37	PNB/TB/MA/TJ.29	CR/BS/BL/RT	P10	Sedimen	cream	Batang	Nonmotil	pos	tidak
38	PNB/TB/MA/TJ.29	CR/SD/BL/RT	P12	Sedimen	cream	<i>Srteptococcus</i>	Motil	pos	ya
39	PNB/TB/MA/AJ.29	PK/BS/BL/RT	P13	Sedimen	pink	Bulat	Nonmotil	pos	ya
40	PNB/TB/MA/TJ.29	CR/BS/BL/RT	P28	Sedimen	cream	Bulat	Nonmotil	pos	ya
41	PNB/TB/MA/TJ.29	KN/BS/BL/RT	P31	Sedimen	kuning	Batang	Motil	neg	ya
42	PNB/TB/MA/TJ.29	PK/BS/BL/RT	P32	Sedimen	pink	Bulat	Motil	pos	tidak
43	PNB/TB/MA/TJ.29	ORG/BS/BL/RT	P36	Sedimen	orange	Bulat	Motil	neg	ya

Keterangan:

neg : negatif; pos : positif

## Lampiran I.5. Isolat hasil seleksi yang diperoleh dari daerah Serang-Banten

No	Kode Isolat	morfologi	Kode Toples	Asal Isolat	Warna isolat	Bentuk sel	Motilitas	Gram stain	pH 2
1	SRG/TP/CBS/AJ.19	HJ/BS/BL/RT	S2	air	hijau	Bulat	Nonmotil	neg	tidak
2	SRG/BV/CBS/AJ.19	KN/BS/BL/RT	S3	air	kuning	Bulat	Nonmotil	neg	tidak
3	SRG/TP/CBS/AJ.19	KN/KC/BL/RT	S4	air	kuning	Bulat	Motil	neg	ya
4	SRG/TP/MA/AJ.19	PK/KC/BL/RT	S6	air	pink	Bulat	Motil	pos	tidak
5	SRG/TP/MA/AJ.19	MR/SD/BL/RT	S18	air	putih	Batang	Nonmotil	pos	tidak
6	SRG/TP/MA/AJ.19	CR-MD/SD/BL/RT	S20	air	cream-muda	Batang	Nonmotil	neg	tidak
7	SRG/TP/MA/AJ.19	CR/KC/BL/RT	S21	air	cream	Bulat	Motil	neg	ya
8	SRG/TP/MA/UJ.19	PU/SD/BL/TR	S7	usus	putih	Bulat	Motil	neg	tidak
9	SRG/TP/MA/UJ.19	CR/KC/BL/RT	S9	usus	cream	Batang	Nonmotil	pos	ya
10	SRG/BV/MA/UJ.19	CK-MD/BS/BL/RT	S16	usus	coklat-muda	Bulat	Motil	neg	ya
11	SRG/BV/MA/UJ.19	CR-TP/KC/BL/RT	S17	usus	cream-transparan	Batang	Motil	pos	tidak
12	SRG/BV/MA/UJ.19	CR/KC/BL/RT	S19	usus	cream	Batang	Motil	neg	tidak
13	SRG/TL/MA/TJ.19	CR/BS/BL/RT	S10	Sedimen	cream	Bulat	Motil	neg	tidak
14	SRG/TL/MA/TJ.19	KN/KC/BL/RT	S11	Sedimen	kuning	Batang	Motil	neg	ya
15	SRG/TL/MA/TJ.19	KN-TA/BS/BL/RT	S13	Sedimen	kuning-tua	Bulat	Nonmotil	neg	tidak
16	SRG/TL/MA/TJ.19	CR/KC/BL/RT	S14	Sedimen	cream	Bulat	Motil	pos	tidak
17	SRG/TL/MA/TJ.19	OR/BS/BL/RT	S23	Sedimen	orange	Batang	Nonmotil	neg	tidak
18	SRG/TP/MA/TJ.19	PK/SD/BL/RT	S24	Sedimen	pink	Bulat	Nonmotil	neg	tidak

## Lampiran I.6. Isolat hasil seleksi yang diperoleh dari daerah Tangerang-Banten

No	Kode Isolat	Morfologi	Kode Toples	Asal isolat	Warna isolat	Bentuk sel	Motilitas	Gram stain	pH 2
1	TGR/TK/MA/AJ.22	CR/BS/BL/RT	T1	air	cream	Batang	Nonmotil	pos	tidak
2	TGR/TK/MA/AJ.22	KN/KC/BL/RT	T2	air	kuning	Bulat	Nonmotil	neg	ya
3	TGR/TK/MA/AJ.22	KN/BS/BL/RT	T4	air	kuning	Bulat	Motil	pos	ya
4	TGR/TK/MA/AJ.22	CK/BS/BL/RT	T11	air	coklat	Bulat	Motil	pos	ya
5	TGR/TK/MA/AJ.22	CR/KC/BL/RT	T14	air	cream	Bulat	Motil	neg	tidak
6	TGR/TK/MA/AJ.22	ORG/KC/BL/RT	T18	air	orange	Batang	Nonmotil	neg	ya
7	TGR/TK/MA/AJ.22	CK/KC/BL/RT	T24	air	coklat	Batang	Nonmotil	pos	tidak
8	TGR/TJ/MA/AJ.22	KN/KC/BL/TR	T31	air	kuning	<i>Staphylococcus</i>	Nonmotil	pos	ya
9	TGR/TJ/MA/AJ.22	ORG/BS/BL/RT	T38	air	orange	Bulat	Motil	neg	tidak
10	TGR/TJ/MA/AJ.22	CK/KC/BL/RT	T39	air	coklat	Bulat	Motil	neg	ya
11	TGR/TJ/MA/AJ.22	CR/BS/BL/RT	T40	air	cream	Bulat	Nonmotil	pos	tidak
12	TGR/TK/MA/UJ.22	KN/BS/BL/RT	T5	usus	kuning	<i>Diplococcus</i>	Motil	neg	tidak
13	TGR/TK/MA/UJ.22	PK/KC/BL/RT	T8	usus	pink	Bulat	Nonmotil	neg	ya
14	TGR/TK/MA/UJ.22	CR/BS/BL/RT	T9	usus	cream	Batang	Motil	neg	ya
15	TGR/TK/MA/UJ.22	KN/KC/BL/RT	T10	usus	kuning	Bulat	Nonmotil	pos	ya
16	TGR/TK/MA/UJ.22	CR/KC/BL/RT	T15	usus	cream	<i>Streptococcus</i>	Nonmotil	neg	tidak
17	TGR/TK/MA/UJ.22	PK/BS/BL/RT	T16	usus	pink	Bulat	Motil	pos	ya
18	TGR/TK/MA/UJ.22	ORG/SD/BL/RT	T17	usus	orange	Batang	Nonmotil	pos	ya
19	TGR/TK/MA/UJ.22	KN/SD/BL/RT	T21	usus	kuning-tua	Batang	Nonmotil	pos	ya
20	TGR/TK/MA/UJ.22	KN-TU/BS/BL/RT	T23	usus	kuning-tua	Bulat	Nonmotil	pos	ya
21	TGR/TJ/MA/UJ.22	KN/BS/BL/RT	T26	usus	kuning	Batang	Nonmotil	pos	ya
22	TGR/TJ/MA/UJ.22	CR/KC/BL/RT	T28	usus	cream	Batang	Nonmotil	pos	ya
23	TGR/TJ/MA/UJ.22	CR/BS/BL/RT	T29	usus	cream	Bulat	Nonmotil	neg	ya
24	TGR/TK/MA/TJ.22	KN/KC/BL/RT	T3	Sedimen	kuning	Bulat	Motil	pos	tidak
25	TGR/TK/MA/TJ.22	CR/KC/BL/RT	T13	Sedimen	cream	Bulat	Nonmotil	pos	ya
26	TGR/TK/MA/TJ.22	ORG/KC/BL/RT	T19	Sedimen	orange	Bulat	Motil	pos	tidak
27	TGR/TK/MA/TJ.22	CK/BS/BL/TR	T20	Sedimen	coklat	Batang	Nonmotil	pos	tidak
28	TGR/TJ/TCBS/TJ.22	HJ/BS/BL/RT	T30	Sedimen	hijau	Bulat	Nonmotil	neg	tidak
29	TGR/TJ/MA/TJ.22	CK/KC/BL/RT	T32	Sedimen	coklat	Bulat	Nonmotil	neg	tidak
30	TGR/TJ/MA/TJ.22	CK/BS/BL/RT	T33	Sedimen	coklat	Bulat	Nonmotil	pos	tidak
31	TGR/TJ/MA/TJ.22	KN/KC/BL/RT	T34	Sedimen	kuning	Bulat	Nonmotil	neg	ya
32	TGR/TJ/MA/TJ.22	ORG/BS/BL/RT	T35	Sedimen	orange	Bulat	Nonmotil	pos	ya
33	TGR/TJ/MA/TJ.22	CK/BS/BL/TR	T36	Sedimen	coklat	Bulat	Nonmotil	pos	ya
34	TGR/TJ/MA/TJ.22	KN/BS/BL/RT	T37	Sedimen	kuning	Bulat	Motil	neg	tidak
35	TGR/TJ/MA/TJ.22	PK/BS/BL/RT	T45	Sedimen	pink	Bulat	Motil	pos	tidak
36	TGR/TJ/MA/TJ.22	CK/BS/BL/RT	T46	Sedimen	coklat	Bulat	Motil	pos	tidak

## Lampiran I.7. Isolat hasil seleksi yang diperoleh dari daerah Karawang-Jawa Barat

No	Kode isolat	Morfologi	Kode Toples	Asal isolat	Warna isolat	Bentuk sel	Motilitas	Gram stain	pH 2
1	KRW/TIR2/MA/AJ.26	ORG/BS/BL/RT	K1	air	orange	Bulat	Motil	pos	ya
2	KRW/TIR2/MA/AJ.26	CR/BS/BL/RT	K4	air	cream	Bulat	Motil	neg	ya
3	KRW/TIR2/MA/AJ.26	KN/BS/BL/RT	K6	air	kuning	Bulat	Motil	neg	tidak
4	KRW/TIR1/MA/AJ.26	CR/KC/BL/RT	K18	air	cream	<i>Staphylococcus</i>	Motil	pos	tidak
5	KRW/TIR1/MA/AJ.26	ORG/KC/BL/RT	K26	air	orange	Bulat	Nonmotil	pos	tidak
6	KRW/TIR1/MA/AJ.26	KN/KC/BL/RT	K27	air	kuning	<i>Staphylococcus</i>	Nonmotil	neg	ya
7	KRW/TIR1/MA/AJ.26	ORG/BS/BL/RT	K28	air	orange	<i>Diplococcus</i>	Nonmotil	neg	tidak
8	KRW/TIR1/MA/AJ.26	CR/BS/BL/RT	K31	air	cream	Bulat	Motil	neg	tidak
9	KRW/TIR1/MA/AJ.26	KN/BS/BL/RT	K33	air	kuning	Bulat	Nonmotil	neg	tidak
10	KRW/TIR3/MA/AJ.26	ORG/BS/BL/RT	K36	air	orange	Batang	Nonmotil	pos	tidak
11	KRW/TIR3/MA/AJ.26	CR/BS/BL/RT	K37	air	cream	Bulat	Nonmotil	neg	tidak
12	KRW/TIR3/MA/AJ.26	KN/BS/BL/RT	K41	air	kuning	<i>Streptococcus</i>	Motil	pos	tidak
13	KRW/TIR3/MA/AJ.26	CR/KC/BL/RT	K46	air	cream	Batang	Motil	neg	tidak
14	KRW/TIR3/MA/AJ.26	ORG/KC/BL/RT	K52	air	orange	Batang	Nonmotil	neg	tidak
15	KRW/TIR3/MA/AJ.26	KN/BS/BL/RT	K53	air	kuning	<i>Diplococcus</i>	Motil	neg	ya
16	KRW/TIR3/MA/AJ.26	KN/KC/BL/RT	K54	air	kuning	Ranatabatang	Nonmotil	neg	tidak
17	KRW/TIR3/MA/AJ.26	ORG/KC/BL/RT	K55	air	orange	Bulat	Motil	pos	ya
18	KRW/TIR2/TCBS/UJ.26	KN/BS/BL/RT	K2	usus	kuning	Bulat	Motil	neg	tidak
19	KRW/TIR2/TCBS/UJ.26	HJ/BS/BL/RT	K3	usus	hijau	<i>Staphylococcus</i>	Motil	neg	ya
20	KRW/TIR2/MA/UJ.26	ORG/KC/BL/RT	K8	usus	orange	Bulat	Nonmotil	neg	tidak
21	KRW/TIR2/MA/UJ.26	KN/KC/BL/RT	K9	usus	kuning	Bulat	Motil	pos	tidak
22	KRW/TIR2/MA/UJ.26	CR/KC/BL/RT	K15	usus	cream	Bulat	Nonmotil	pos	ya
23	KRW/TIR1/MA/UJ.26	CR/KC/BL/RT	K20	usus	cream	Bulat	Motil	neg	tidak
24	KRW/TIR1/MA/UJ.26	CR/BS/BL/RT	K21	usus	cream	Bulat	Motil	pos	tidak
25	KRW/TIR1/MA/UJ.26	ORG/KC/BL/RT	K24	usus	orange	Diplobatang	Motil	pos	tidak
26	KRW/TIR1/TCBS/UJ.26	HJ/BS/BL/RT	K29	usus	hijau	Bulat	Motil	neg	tidak
27	KRW/TIR1/TCBS/UJ.26	KN/BS/BL/RT	K30	usus	kuning	Bulat	Nonmotil	neg	tidak
28	KRW/TIR3/MA/UJ.26	CR/KC/BL/RT	K34	usus	cream	Bulat	Motil	pos	tidak
29	KRW/TIR3/MA/UJ.26	ORG/KC/BL/RT	K39	usus	orange	Cocobatang	Motil	neg	tidak
30	KRW/TIR3/TCBS/UJ.26	HJ/KC/BL/RT	K44	usus	hijau	Batang	Nonmotil	neg	tidak
31	KRW/TIR2/MA/TJ.26	PK/KC/BL/RT	K7	Sedimen	pink	Bulat	Motil	neg	tidak
32	KRW/TIR2/MA/TJ.26	KN/BS/BL/RT	K10	Sedimen	kuning	<i>Staphylococcus</i>	Nonmotil	neg	ya
33	KRW/TIR2/MA/TJ.26	ORG/KC/BL/RT	K11	Sedimen	orange	Batang	Motil	neg	ya
34	KRW/TIR2/MA/TJ.26	CR/KC/BL/RT	K13	Sedimen	cream	<i>Streptococcus</i>	Nonmotil	pos	ya
35	KRW/TIR2/MA/TJ.26	CR/BS/BL/RT	K16	Sedimen	cream	Bulat	Nonmotil	pos	tidak
36	KRW/TIR1/MA/TJ.26	CR/KC/BL/RT	K19	Sedimen	cream	Bulat	Motil	pos	tidak
37	KRW/TIR1/MA/TJ.26	CR/BS/BL/RT	K22	Sedimen	cream	<i>Staphylococcus</i>	Nonmotil	pos	ya
38	KRW/TIR1/MA/TJ.26	ORG/BS/BL/RT	K23	Sedimen	orange	Bulat	Motil	pos	ya
39	KRW/TIR1/MA/TJ.26	ORG/KC/BL/RT	K25	Sedimen	orange	Bulat	Motil	neg	tidak
40	KRW/TIR1/MA/TJ.26	KN/KC/BL/RT	K32	Sedimen	kuning	Bulat	Motil	neg	tidak
41	KRW/TIR3/MA/TJ.26	KN/KC/BL/RT	K35	Sedimen	kuning	Batang	Motil	neg	ya
42	KRW/TIR3/MA/TJ.26	KN/SD/BL/RT	K40	Sedimen	kuning	Bulat	Nonmotil	neg	tidak
43	KRW/TIR3/MA/TJ.26	KN/BS/BL/RT	K45	Sedimen	kuning	Bulat	Motil	pos	tidak
44	KRW/TIR3/MA/TJ.26	CR/KC/BL/RT	K48	Sedimen	cream	Batang	Nonmotil	neg	ya
45	KRW/TIR3/MA/TJ.26	CR/BS/BL/RT	K49	Sedimen	cream	Bulat	Nonmotil	neg	ya
46	KRW/TIR3/MA/TJ.26	ORG/BS/BL/RT	K50	Sedimen	orange	Batang	Motil	pos	tidak
47	KRW/TIR3/MA/TJ.26	ORG/KC/BL/RT	K51	Sedimen	orange	Batang	Nonmotil	pos	tidak

## Lampiran I.8. Isolat hasil seleksi yang diperoleh dari daerah Pandeglang-Jawa Barat

No	Kode Isolat	Morfologi	Kode Toples	Asal isolat	Warna isolat	Bentuk sel	Motilitas	Gram stain	pH2
1	PNB/TB/MA/A/J.29	PK/KC/BL/RT	P3	air	pink	Batang	Nonmotil	pos	ya
2	PNB/TB/MA/A/J.29	CR-TP/BS/BL/RT	P11	air	cream-transparan	Batang	Motil	pos	tidak
3	PNB/TB/MA/A/J.29	CR/SD/BL/RT	P15	air	cream	<i>Srteptococcus</i>	Motil	neg	ya
4	PNB/TB/MA/A/J.29	CR/BS/BL/RT	P16	air	cream	Batang	Motil	neg	tidak
5	PNB/TB/TCBS/A/J.29	HJ/SD/BL/RT	P17	air	hijau	Bulat	Nonmotil	neg	tidak
6	PNB/TB/TCBS/A/J.29	HJ/KC/BL/RT	P23	air	hijau	Bulat	Nonmotil	neg	ya
7	PNB/TB/TCBS/A/J.29	KN/KC/BL/RT	P25	air	kuning	Bulat	Nonmotil	neg	ya
8	PNB/TB/MA/A/J.29	KN/KC/BL/RT	P27	air	kuning	Bulat	Motil	pos	tidak
9	PNB/TB/MA/A/J.29	CR/SD/BL/RT	P33	air	cream	Bulat	Motil	pos	tidak
10	PNB/TK/MA/A/J.29	KN/BS/BL/RT	P34	air	kuning	Bulat	Motil	neg	ya
11	PNB/TK/MA/A/J.29	ORG/BS/BL/RT	P35	air	orange	Cocccobatang	Motil	pos	ya
12	PNB/TB/MA/A/J.29	CR/BS/BL/RT	P37	air	cream	Bulat	Nonmotil	neg	tidak
13	PNB/TB/MA/A/J.29	CR-TP/KC/BL/RT	P38	air	cream-transparan	Bulat	Nonmotil	pos	tidak
14	PNB/TK/MA/A/J.29	CR-TP/BS/BL/RT	P39	air	cream-transparan	Bulat	Motil	neg	ya
15	PNB/TB/MA/A/J.29	KN/SD/BL/RT	P40	air	kuning	Bulat	Nonmotil	pos	tidak
16	PNB/TK/MA/A/J.29	CR/BS/BL/RT	P42	air	cream	<i>Staphylococcus</i>	Nonmotil	pos	ya
17	PNB/TB/MA/A/J.29	CR/KC/BL/RT	P43	air	cream	Batang	Motil	pos	ya
18	PNB/TB/MA/U/J.29	PK/KC/BL/RT	P8	usus	pink	Bulat	Nonmotil	neg	ya
19	PNB/TB/MA/U/J.29	CR/KC/BL/RT	P9	usus	cream	Bulat	Nonmotil	neg	ya
20	PNB/TB/MA/U/J.29	KN/SD/BL/RT	P18	usus	kuning	Batang	Nonmotil	neg	tidak
21	PNB/TB/TCBS/U/J.29	HJ/BS/BL/RT	P19	usus	hijau	Bulat	Nonmotil	neg	tidak
22	PNB/TB/TCBS/U/J.29	KN/BS/BL/RT	P20	usus	kuning	Bulat	Nonmotil	neg	ya
23	PNB/TB/TCBS/U/J.29	KN/KC/BL/RT	P24	usus	kuning	Bulat	Motil	pos	tidak
24	PNB/TB/MA/U/J.29	CR/KC/BL/RT	P29	usus	cream	Bulat	Motil	neg	tidak
25	PNB/TB/MA/T/J.29	KN/BS/BL/RT	P1	sedimen	kuning	Bulat	Motil	pos	ya
26	PNB/TB/MA/T/J.29	CR/KC/BL/RT	P4	sedimen	cream	<i>Srteptobasil</i>	Motil	pos	tidak
27	PNB/TB/MA/T/J.29	KN-TU/BS/BL/RT	P5	sedimen	kuning-tua	Bulat	Motil	neg	ya
28	PNB/TB/MA/T/J.29	PK/BS/BL/RT	P7	sedimen	pink	batang	Motil	pos	ya
29	PNB/TB/MA/T/J.29	CR/BS/BL/RT	P10	sedimen	cream	Batang	Nonmotil	pos	tidak
30	PNB/TB/MA/T/J.29	CR/SD/BL/RT	P12	sedimen	cream	<i>Srteptococcus</i>	Motil	pos	ya
31	PNB/TB/MA/A/J.29	PK/BS/BL/RT	P13	sedimen	pink	Bulat	Nonmotil	pos	ya
32	PNB/TK/MA/T/J.29	CR/BS/BL/RT	P28	sedimen	cream	Bulat	Nonmotil	pos	ya
33	PNB/TK/MA/T/J.29	KN/BS/BL/RT	P31	sedimen	kuning	Batang	Motil	neg	ya
34	PNB/TK/MA/T/J.29	PK/BS/BL/RT	P32	sedimen	pink	Bulat	Motil	pos	tidak
35	PNB/TB/MA/T/J.29	ORG/BS/BL/RT	P36	sedimen	orange	Bulat	Motil	neg	ya

**Lampiran I.9. Hasil pengujian statistik evaluasi wadah (toples) yang digunakan selama penelitian**

*Analysis of variance (ANOVA)*

Kelangsungan hidup udang

	<i>Sum of Squares</i>	<i>df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F</i>	<i>Sig.</i>
<i>Between Groups</i>	.125	1	.125	.015	.905
<i>Within Groups</i>	48.750	6	8.125		
<i>Total</i>	48.875	7			

Ket:

*df. degree of freedom*

*Sig. : significance*





**Lampiran I.10. Hasil pengujian statistik penentuan konsentrasi bakteri *Vibrio harveyi***

*Analysis of variance (ANOVA)*

**Mortalitas udang**

	<i>Sum of Squares</i>	<i>df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F</i>	<i>Sig.</i>
<i>Between Groups</i>	11523.333	4	2880.833	82.310	.000
<i>Within Groups</i>	350.000	10	35.000		
<i>Total</i>	11873.333	14			

Ket:

*df: degree of freedom*

*Sig. : significance*

**Uji pembandingan berganda**

*Dependent Variable: mortalitas*

*Dunnett t (2-sided)*

(I) perlakuan	(J) perlakuan	<i>Mean Difference (I-J)</i>	<i>Std. Error</i>	<i>Sig.</i>	<i>95% Confidence Interval</i>	
					<i>Lower Bound</i>	<i>Upper Bound</i>
10 <sup>4</sup>	kontrol	3.33333	4.83046	.893	-10.6290	17.2957
10 <sup>5</sup>	kontrol	11.66667	4.83046	.108	-2.2957	25.6290
10 <sup>6</sup>	kontrol	51.66667*	4.83046	.000	37.7043	65.6290
10 <sup>7</sup>	kontrol	68.33333*	4.83046	.000	54.3710	82.2957

\* *The mean difference is significant at the .05 level.*

a *Dunnett t-tests treat one group as a control, and compare all other groups against it.*

**Lampiran I.11. Hasil pengujian statistik kelangsungan hidup udang vannamei dari Daerah Serang**

*Analysis of variance (ANOVA)*

Kelangsungan hidup udang

	<i>Sum of Squares</i>	<i>df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F</i>	<i>Sig.</i>
<i>Between Groups</i>	6850.330	18	380.574	2.266	.017
<i>Within Groups</i>	6381.403	38	167.932		
<i>Total</i>	13231.733	56			

Ket:

*df: degree of freedom*

*Sig. : significance*

Uji pembandingan berganda

*Dependent Variable: Kelangsungan hidup  
Dunnnett t (2-sided)*

(I) perlakuan	(J) perlakuan	<i>Mean Difference (I-J)</i>	<i>Std. Error</i>	<i>Sig.</i>	<i>95% Confidence Interval</i>	
					<i>Lower Bound</i>	<i>Upper Bound</i>
2	kontrol	1.05556	10.58085	1.000	-31.0257	33.1368
3	kontrol	4.66667	10.58085	1.000	-27.4146	36.7479
4	kontrol	4.66667	10.58085	1.000	-27.4146	36.7479
6	kontrol	7.44444	10.58085	.999	-24.6368	39.5257
7	kontrol	8.55556	10.58085	.997	-23.5257	40.6368
9	kontrol	1.05556	10.58085	1.000	-31.0257	33.1368
10	kontrol	-40.33333*	10.58085	.007	-72.4146	-8.2521
11	kontrol	-7.00000	10.58085	1.000	-39.0812	25.0812
13	kontrol	1.32222	10.58085	1.000	-30.7590	33.4035
14	kontrol	5.77778	10.58085	1.000	-26.3035	37.8590
16	kontrol	1.05556	10.58085	1.000	-31.0257	33.1368
17	kontrol	-2.55556	10.58085	1.000	-34.6368	29.5257
18	kontrol	1.61109	10.58085	1.000	-30.4702	33.6923
19	kontrol	-.05556	10.58085	1.000	-32.1368	32.0257
20	kontrol	-5.05556	10.58085	1.000	-37.1368	27.0257
21	kontrol	-1.16678	10.58085	1.000	-33.2480	30.9145
23	kontrol	18.55444	10.58085	.563	-13.5268	50.6357
24	kontrol	-4.22222	10.58085	1.000	-36.3035	27.8590

\* The mean difference is significant at the .05 level.

a Dunnnett t-tests treat one group as a control, and compare all other groups against it.

**Lampiran I.12. Hasil pengujian statistik kelangsungan hidup udang vannamei Daerah Tangerang**

*Analysis of variance (ANOVA)*

Kelangsungan hidup udang

	<i>Sum of Squares</i>	<i>df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F</i>	<i>Sig.</i>
<i>Between Groups</i>	25520.936	36	708.915	4.811	.000
<i>Within Groups</i>	10903.133	74	147.340		
<i>Total</i>	36424.070	110			

Ket:

df: *degree of freedom*

Sig. : *significance*

**Uji pembandingan berganda**

*Dependent Variable: Kelangsungan hidup  
Dunnnett t (2-sided)*

(I) perlakuan	(J) perlakuan	<i>Mean Difference (I-J)</i>	<i>Std. Error</i>	<i>Sig.</i>	<i>95% Confidence Interval</i>	
					<i>Lower Bound</i>	<i>Upper Bound</i>
1.00	kontrol	4.76667	9.91092	1.000	-26.3953	35.9287
2.00	kontrol	2.83333	9.91092	1.000	-28.3287	33.9953
3.00	kontrol	4.46667	9.91092	1.000	-26.6953	35.6287
4.00	kontrol	.33333	9.91092	1.000	-30.8287	31.4953
5.00	kontrol	-.23333	9.91092	1.000	-31.3953	30.9287
8.00	kontrol	.90000	9.91092	1.000	-30.2620	32.0620
9.00	kontrol	7.53333	9.91092	1.000	-23.6287	38.6953
10.00	kontrol	2.56667	9.91092	1.000	-28.5953	33.7287
11.00	kontrol	4.50000	9.91092	1.000	-26.6620	35.6620
13.00	kontrol	-5.23333	9.91092	1.000	-36.3953	25.9287
14.00	kontrol	2.00000	9.91092	1.000	-29.1620	33.1620
15.00	kontrol	2.83333	9.91092	1.000	-28.3287	33.9953
16.00	kontrol	.30000	9.91092	1.000	-30.8620	31.4620
17.00	kontrol	2.53333	9.91092	1.000	-28.6287	33.6953
18.00	kontrol	7.56667	9.91092	1.000	-23.5953	38.7287
19.00	kontrol	-4.10000	9.91092	1.000	-35.2620	27.0620
20.00	kontrol	2.53333	9.91092	1.000	-28.6287	33.6953
21.00	kontrol	2.53333	9.91092	1.000	-28.6287	33.6953
23.00	kontrol	-.23333	9.91092	1.000	-31.3953	30.9287
24.00	kontrol	-9.10000	9.91092	1.000	-40.2620	22.0620
26.00	kontrol	9.76667	9.91092	.999	-21.3953	40.9287
28.00	kontrol	.86667	9.91092	1.000	-30.2953	32.0287

29.00	kontrol	-4.66667	9.91092	1.000	-35.8287	26.4953
30.00	kontrol	-41.33333*	9.91092	.002	-72.4953	-10.1713
31.00	kontrol	-1.90000	9.91092	1.000	-33.0620	29.2620
32.00	kontrol	-7.73333	9.91092	1.000	-38.8953	23.4287
33.00	kontrol	-39.66667*	9.91092	.004	-70.8287	-8.5047
34.00	kontrol	-12.73333*	9.91092	.972	-43.8953	18.4287
35.00	kontrol	-21.33333*	9.91092	.417	-52.4953	9.8287
36.00	kontrol	-38.00000*	9.91092	.007	-69.1620	-6.8380
37.00	kontrol	-6.63333	9.91092	1.000	-37.7953	24.5287
38.00	kontrol	-37.46667*	9.91092	.008	-68.6287	-6.3047
39.00	kontrol	-9.40000*	9.91092	1.000	-40.5620	21.7620
40.00	kontrol	-36.90000*	9.91092	.010	-68.0620	-5.7380
45.00	kontrol	-39.70000*	9.91092	.004	-70.8620	-8.5380
46.00	kontrol	-6.90000	9.91092	1.000	-38.0620	24.2620

\* The mean difference is significant at the .05 level.

a Dunnett t-tests treat one group as a control, and compare all other groups against it.



**Lampiran I.13. Hasil pengujian statistik kelangsungan hidup udang vannamei  
Daerah Karawang**

**Analysis of variance (ANOVA)**

**Kelangsungan hidup udang**

	<i>Sum of Squares</i>	<i>df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F</i>	<i>Sig.</i>
<i>Between Groups</i>	46357.654	47	986.333	4.257	.000
<i>Within Groups</i>	22243.817	96	231.706		
<i>Total</i>	68601.471	143			

Ket:

df: *degree of freedom*

Sig. : *significance*

**Uji pembandingan berganda**

*Dependent Variable: hasil  
Dunnett t (2-sided)*

(I) perlakuan	(J) perlakuan	<i>Mean Difference (I-J)</i>	<i>Std. Error</i>	<i>Sig.</i>	<i>95% Confidence Interval</i>	
					<i>Lower Bound</i>	<i>Upper Bound</i>
1.00	kontrol	-34.12233*	12.42863	.150	-73.7936	5.5489
2.00	kontrol	-61.35567*	12.42863	.000	-101.0269	-21.6844
3.00	kontrol	-34.67800*	12.42863	.135	-74.3493	4.9933
4.00	kontrol	-50.23333*	12.42863	.004	-89.9046	-10.5621
6.00	kontrol	-6.62233	12.42863	1.000	-46.2936	33.0489
7.00	kontrol	-8.01133	12.42863	1.000	-47.6826	31.6599
8.00	kontrol	-13.84433*	12.42863	.999	-53.5156	25.8269
9.00	kontrol	-49.12233*	12.42863	.005	-88.7936	-9.4511
10.00	kontrol	-1.90000	12.42863	1.000	-41.5713	37.7713
11.00	kontrol	-24.67767	12.42863	.593	-64.3489	14.9936
13.00	kontrol	-25.78900*	12.42863	.523	-65.4603	13.8823
15.00	kontrol	-44.12233*	12.42863	.018	-83.7936	-4.4511
16.00	kontrol	-8.84467	12.42863	1.000	-48.5159	30.8266
18.00	kontrol	-19.66667*	12.42863	.889	-59.3379	20.0046
19.00	kontrol	-12.17767	12.42863	1.000	-51.8489	27.4936
20.00	kontrol	4.21100	12.42863	1.000	-35.4603	43.8823
21.00	kontrol	-30.23333*	12.42863	.286	-69.9046	9.4379
22.00	kontrol	-19.67767*	12.42863	.889	-59.3489	19.9936
23.00	kontrol	6.43333	12.42863	1.000	-33.2379	46.1046
24.00	kontrol	-20.78867*	12.42863	.834	-60.4599	18.8826
25.00	kontrol	-6.90000	12.42863	1.000	-46.5713	32.7713
26.00	kontrol	1.98900	12.42863	1.000	-37.6823	41.6603
27.00	kontrol	-1.62200	12.42863	1.000	-41.2933	38.0493
28.00	kontrol	-5.23333	12.42863	1.000	-44.9046	34.4379

29.00	kontrol	-6.90000	12.42863	1.000	-46.5713	32.7713
30.00	kontrol	-6.89967	12.42863	1.000	-46.5709	32.7716
31.00	kontrol	-41.34433*	12.42863	.035	-81.0156	-1.6731
32.00	kontrol	-10.23333	12.42863	1.000	-49.9046	29.4379
33.00	kontrol	-1.90000	12.42863	1.000	-41.5713	37.7713
34.00	kontrol	7.53333	12.42863	1.000	-32.1379	47.2046
35.00	kontrol	-1.06667	12.42863	1.000	-40.7379	38.6046
36.00	kontrol	-3.01100	12.42863	1.000	-42.6823	36.6603
37.00	kontrol	6.98867	12.42863	1.000	-32.6826	46.6599
39.00	kontrol	-.23333	12.42863	1.000	-39.9046	39.4379
40.00	kontrol	-2.17800	12.42863	1.000	-41.8493	37.4933
41.00	kontrol	6.43333	12.42863	1.000	-33.2379	46.1046
44.00	kontrol	-40.23333*	12.42863	.044	-79.9046	-.5621
45.00	kontrol	6.42200	12.42863	1.000	-33.2493	46.0933
46.00	kontrol	-4.95567	12.42863	1.000	-44.6269	34.7156
48.00	kontrol	10.86667	12.42863	1.000	-28.8046	50.5379
49.00	kontrol	.04433	12.42863	1.000	-39.6269	39.7156
50.00	kontrol	1.98900	12.42863	1.000	-37.6823	41.6603
51.00	kontrol	1.98900	12.42863	1.000	-37.6823	41.6603
52.00	kontrol	7.54433	12.42863	1.000	-32.1269	47.2156
53.00	kontrol	1.43333	12.42863	1.000	-38.2379	41.1046
54.00	kontrol	6.98900	12.42863	1.000	-32.6823	46.6603
55.00	kontrol	6.42200	12.42863	1.000	-33.2493	46.0933

\* The mean difference is significant at the .05 level.

a Dunnett t-tests treat one group as a control, and compare all other groups against it.

**Lampiran I.14. Hasil pengujian statistik kelangsungan hidup udang vannamei  
Daerah Pandeglang**

**Analysis of variance (ANOVA)**

Kelangsungan hidup udang

	<i>Sum of Squares</i>	<i>df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F</i>	<i>Sig.</i>
<i>Between Groups</i>	20341.247	35	581.178	4.763	.000
<i>Within Groups</i>	8786.262	72	122.031		
<i>Total</i>	29127.509	107			

Ket:

df: *degree of freedom*

Sig. : *significance*

**Uji pembandingan berganda**

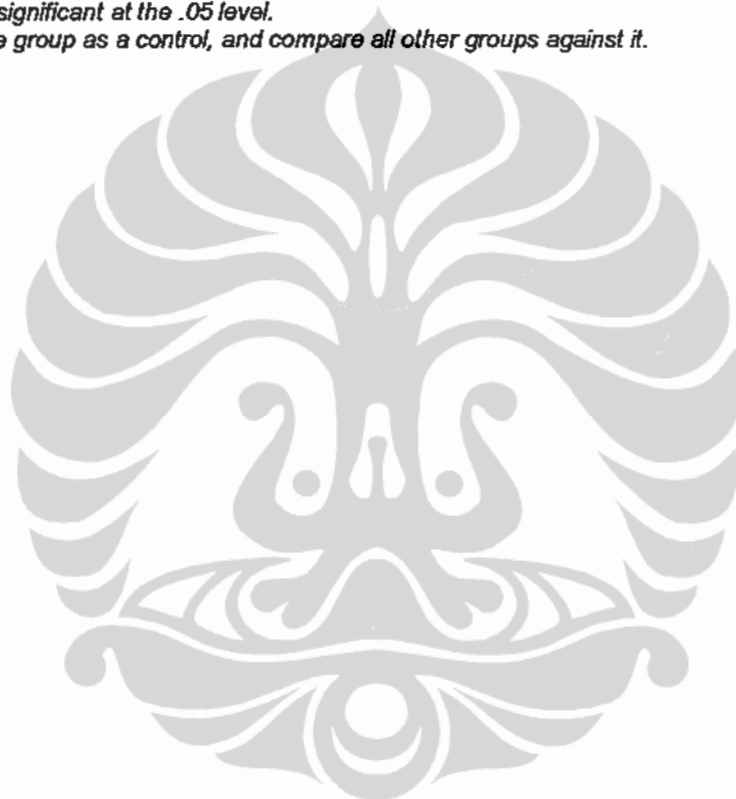
*Dependent Variable: hasil  
Dunnnett t (2-sided)*

(I) perlakuan	(J) perlakuan	<i>Mean Difference (I-J)</i>	<i>Std. Error</i>	<i>Sig.</i>	<i>95% Confidence Interval</i>	
					<i>Lower Bound</i>	<i>Upper Bound</i>
1.00	kontrol	4.21133	9.01966	1.000	-24.1039	32.5266
3.00	kontrol	.32200	9.01966	1.000	-27.9933	28.6373
4.00	kontrol	2.54433	9.01966	1.000	-25.7709	30.8596
5.00	kontrol	1.98900	9.01966	1.000	-26.3263	30.3043
7.00	kontrol	3.10000	9.01966	1.000	-25.2153	31.4153
8.00	kontrol	-36.90000*	9.01966	.003	-65.2153	-8.5847
9.00	kontrol	-1.34433	9.01966	1.000	-29.6596	26.9709
10.00	kontrol	6.43333	9.01966	1.000	-21.8819	34.7486
11.00	kontrol	2.54433	9.01966	1.000	-25.7709	30.8596
12.00	kontrol	-34.66667*	9.01966	.007	-62.9819	-6.3514
13.00	kontrol	1.98867	9.01966	1.000	-26.3266	30.3039
15.00	kontrol	6.15567	9.01966	1.000	-22.1596	34.4709
16.00	kontrol	2.54433	9.01966	1.000	-25.7709	30.8596
17.00	kontrol	8.10000	9.01966	1.000	-20.2153	36.4153
18.00	kontrol	5.87767	9.01966	1.000	-22.4376	34.1929
19.00	kontrol	2.54433	9.01966	1.000	-25.7709	30.8596
20.00	kontrol	3.10000	9.01966	1.000	-25.2153	31.4153
23.00	kontrol	4.21100	9.01966	1.000	-24.1043	32.5263
24.00	kontrol	.32233	9.01966	1.000	-27.9929	28.6376
25.00	kontrol	11.43333	9.01966	.974	-16.8819	39.7486
27.00	kontrol	5.32233	9.01966	1.000	-22.9929	33.6376
28.00	kontrol	-43.01100*	9.01966	.000	-71.3263	-14.6957
29.00	kontrol	4.76667	9.01966	1.000	-23.5486	33.0819
31.00	kontrol	-5.78900	9.01966	1.000	-34.1043	22.5263

32.00	kontrol	8.65533	9.01966	.999	-19.6599	36.9706
33.00	kontrol	5.32200	9.01966	1.000	-22.9933	33.6373
34.00	kontrol	-1.06667	9.01966	1.000	-29.3819	27.2486
35.00	kontrol	-3.56633	9.01966	1.000	-31.8816	24.7489
36.00	kontrol	4.21133	9.01966	1.000	-24.1039	32.5266
37.00	kontrol	-1.06667	9.01966	1.000	-29.3819	27.2486
38.00	kontrol	-3.01100	9.01966	1.000	-31.3263	25.3043
39.00	kontrol	-43.56667(*)	9.01966	.000	-71.8819	-15.2514
40.00	kontrol	-3.56667	9.01966	1.000	-31.8819	24.7486
42.00	kontrol	.32233	9.01966	1.000	-27.9929	28.6376
43.00	kontrol	1.71133	9.01966	1.000	-26.6039	30.0266

\* The mean difference is significant at the .05 level.

a Dunnett t-tests treat one group as a control, and compare all other groups against it.







**MAKALAH II**

**SELEKSI BAKTERI PROBIOTIK LOKAL BERDASARKAN KEMAMPUAN  
TERAPI PADA UDANG VANNAMEI (*Litopenaeus vannamei*) (Boone) YANG  
TERINFEKSI *WHITE SPOT SYNDROME VIRUS* (WSSV)**

## MAKALAH II

# SELEKSI BAKTERI PROBIOTIK LOKAL BERDASARKAN KEMAMPUAN TERAPI PADA UDANG VANNAMEI (*Litopenaeus vannamei*) (Boone) YANG TERINFEKSI *WHITE SPOT SYNDROME VIRUS* (WSSV)\*

Tubagus Haeru Rahayu  
(0606037443)

### ABSTRACT

In a preliminary study, a total of 71 indigenous bacterial isolates were selected as potential probiotics for vannamei shrimps *Litopenaeus vannamei*. These isolates were obtained from water, sediment, and the guts of healthy adult shrimps from Pandeglang, Serang, Tangerang, and Karawang. The aim of this study was to select further of putative probiotics bacteria based on their ability to cure vannamei shrimps infected by white spot syndrome virus (WSSV). Sixteen specific pathogenic free (SPF) juveniles of vannamei shrimps per container were previously immersed in a  $10^{-5}$  diluted WSSV stock medium for three hours to assess the efficacy of indigenous bacteria as therapeutic agent. The juveniles were then transferred to the water cultures containing  $10^6 \text{ ml}^{-1}$  of 71 putative probiotic bacteria for 21 days. In this study, several parameters were examined *i.e.* the shrimp survival rate, the shrimp immunity indexes, the gills and the hepatopancreas histopathology, and the existence of WSSV in shrimp. A total of 19 out of the 71 isolates showed the ability to cure the shrimps infected by WSSV indicated by increasing the survival rate from 8.3%, to 24.9%-58.3%, increasing phagocyte activity from 11% to 17.7%-30%, total haemocytes from  $11.300 \text{ cel. mm}^{-1}$  to  $18.000\text{-}29.000 \text{ cel. mm}^{-1}$ , better gill and hepatopancreas histopathological performances, and negative detection of WSSV in the vannamei shrimps compared to the control (no bacterial addition). The 19 isolates showed the ability as therapeutic agent towards WSSV in vannamei shrimp culture.

**Keywords:** Probiotic; immunity indexes; *Litopenaeus vannamei*; WSSV.

---

\* Makalah ini dalam format lain telah dipresentasikan pada The 4<sup>th</sup> Indonesian Biotechnology Conference, 5-7 Agustus 2008, di Bogor.

## PENDAHULUAN

Budidaya udang merupakan kegiatan akuakultur yang perkembangannya cukup pesat di dunia. Produksi udang hasil budidaya mampu mencapai lebih dari 25% dari total produksi udang (FAO 2001). Produksi udang di Asia Tenggara, termasuk Indonesia, banyak didominasi oleh udang putih vannamei, *Litopenaeus vannamei* menggantikan posisi udang windu, *Penaeus monodon* yang banyak diserang penyakit, terutama oleh *white spot syndrome virus* (WSSV) (Rengpipat dkk. 2003; Geovanny dkk. 2007).

Sejak tahun 1933, WSSV telah dilaporkan menginfeksi udang *penaeid* (Magbanua dkk. 2000). WSSV menjadi penyebab utama kematian masal dan mengakibatkan kerugian ekonomi global dalam budidaya udang. Mc Clennen (2004) menyatakan bahwa, berjangkitnya WSSV pada budidaya udang di pertambakan secara meluas dimulai tahun 1992 di Asia tengah (China), kemudian menyebar ke Asia Tenggara termasuk Indonesia dan Australia, dan sejak tahun 1995 WSSV telah menyebar ke benua Amerika.

WSSV disebabkan oleh virus DNA beruntai ganda (dsDNA), yang tergolong famili *Nimaviridae* dan genus *Whispovirus* (Witteveldt dkk. 2004). WSSV memiliki *virion* berbentuk batang hingga bulat panjang dengan ukuran 80-120 x 250-380 nm (Gambar II.1).



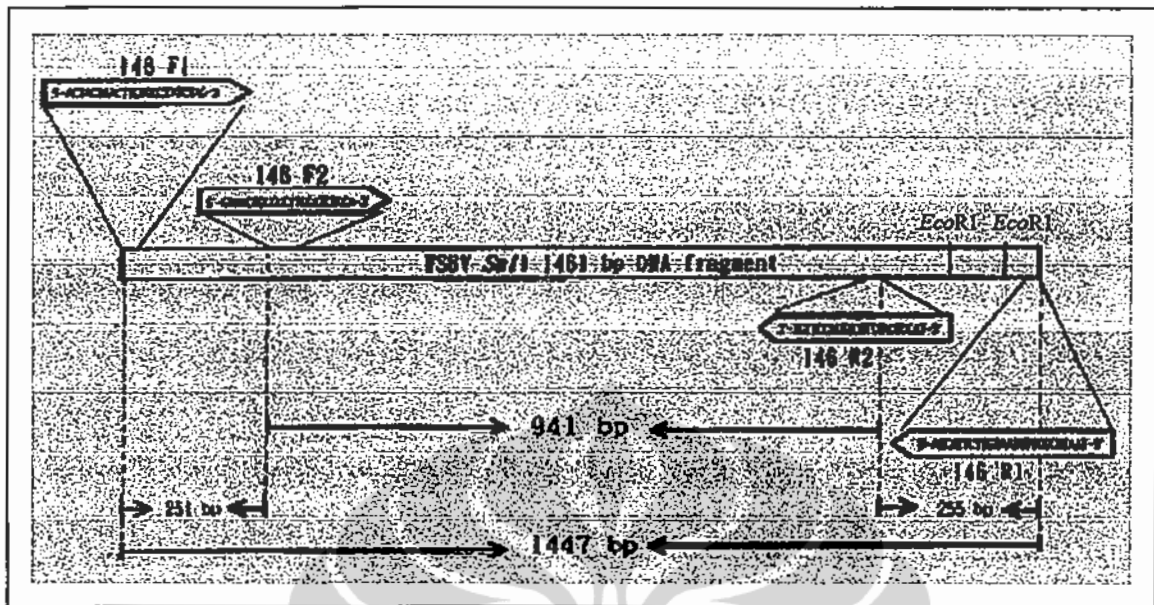
**Gambar II.1.** Morfologi pewarnaan negatif virion WSSV pada mikroskop elektron yang dipurifikasi dengan sentrifugasi gradient sukrosa. Garis skala 0.1  $\mu\text{m}$  [Sumber: Lo dkk. 1996].

Terdapat tiga ukuran genom WSSV saat ini yang telah publikasikan dan tercatat pada *GenBank*, yaitu: 305.107 pb (*GenBank Accession No.* AF332093) berasal dari China (Gambar II.2), 292.967 pb (*GenBank Accession No.* AF369029) berasal dari Thailand dan 307.287 pb (*GenBank Accession No.* AF440570) berasal dari China Taipei (OIE 2005). Genom tersebut diperoleh dari sumber organisme *shrimp white spot syndrome virus* atau *shrimp white spot bacilliform virus*. *Virion* WSSV terdiri dari setidaknya lima protein utama dengan estimasi ukurannya yaitu: 15kDa (VP15), 19 kDa (VP19), 24 kDa (VP24), 26 kDa (VP26), dan 28 kDa (VP28) serta 13 protein minor dengan nukleokapsid (Jha & Xu 2005).



tersebut memiliki kelemahan di antaranya: tidak dapat mendeteksi stadium dini, kurang akurat, relatif kompleks, dan membutuhkan waktu relatif lama (Nilsson & Strom 2002).

Sejalan dengan perkembangan metode *polymerase chain reaction* (PCR), virus WSSV dapat dideteksi dengan metode (PCR) menggunakan primer spesifik yang berasal gen struktural *envelope protein* VP28 dari organisme *shrimp white spot syndrome virus* (Lo dkk. 1996; Van Hulten dkk. 2001; OIE 2005). Primer tersebut diperoleh melalui pemotongan *fragment* DNA menggunakan enzim restriksi (Lo dkk. 1996). Primer spesifik merupakan suatu sekuen oligonukleotida pendek yang berfungsi mengawali sintesis rantai DNA dalam proses PCR. Lo dkk. (1996) menggunakan primer spesifik WSSV 146F1- 146R1 yang berasal dari organisme *shrimp white spot syndrome virus*, hasil restriksi enzim *Sal1* dari sekuen klon DNA WSBV (*white spot baculovirus*) pada 1461 pb. (Gambar II. 3).



**Gambar II.3.** Diagram dari *Sall*-1461 pb fragmen DNA klon dalam plasmid *psm* 146. Lokasi dari primer yang digunakan untuk PCR yaitu: 146F1 dan 146R1 dengan amplifikasi 1447 pb serta 146F2 dan 146R2 dengan amplifikasi 941 pb ditunjukkan. Posisi 2 enzim restriksi *EcoRI* juga ditunjukkan [Sumber: Lo dkk. 1996].

Metode PCR adalah metode yang sangat sensitif. Sensitivitas tersebut membuatnya dapat digunakan untuk melipatgandakan satu molekul DNA hingga 200 ribu kali setelah dilakukan 20 siklus selama 220 menit (Yuwono 2006). Keuntungan lain metode PCR adalah: reaksinya dapat dilakukan dengan menggunakan komponen dalam jumlah sangat sedikit, misalnya *template* DNA yang diperlukan hanya  $\pm 5 \mu\text{g}$  (Lo dkk. 1996). *Template* DNA yang digunakan juga tidak perlu dimurnikan terlebih dahulu, sehingga metode PCR dapat digunakan untuk melipatgandakan suatu sekuen DNA dalam genom bakteri hanya mencampurkan kultur bakteri di

dalam tabung PCR (Yuwono 2006). Metode PCR, saat ini dijadikan metode baku untuk mendeteksi penyakit virus pada *hatchery* dan tambak udang (Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya 2004).

Penanggulangan terhadap serangan penyakit pada akuakultur yang umum diterapkan oleh pembudidaya adalah penggunaan vaksin (Namikoshi dkk. 2004), imunostimulan (Chang dkk. 1999; Villamil dkk. 2002) dan probiotik (Gatesoupe 1999; Verschuere dkk. 2000). Probiotik banyak digunakan dalam budidaya udang untuk pencegahan (*preventive*) penyakit dan meningkatkan produksi, sejalan dengan isu global tentang budidaya berkelanjutan (*sustainable aquaculture*).

Verschuere dkk. (2000) mendefinisikan probiotik dalam akuakultur sebagai penambahan mikroorganisme hidup yang memiliki pengaruh menguntungkan bagi inang melalui modifikasi bentuk keterikatan (asosiasi) dengan inang atau komunitas mikroorganisme lingkungan hidupnya, mengoptimalkan penggunaan pakan atau meningkatkan nilai nutrisinya, berkompetisi dengan mikroorganisme yang merugikan untuk nutrien, energi dan tempat, meningkatkan respon imunitas, memperbaiki kualitas air, dan mampu berinteraksi dengan fitoplankton.

Verschuere dkk. (2000) menyatakan, penelitian tentang probiotik telah banyak dilakukan di bidang akuakultur. Beberapa obyek yang dijadikan indikator dalam penelitian tersebut di antaranya adalah: telur ikan dan larva, juvenil ikan dan ikan dewasa, *crustacea*, moluska, pakan hidup (*live food*)



seperti *Artemia* dan *Rotifera*, interaksi dengan efek nutrisi, dan media pemeliharaan yang telah dikondisikan (*microbially matured water*).

Mekanisme/model kerja dari probiotik antara lain: memproduksi komponen penghambat, kompetisi untuk zat kimia tertentu, tempat atau energi yang tersedia, meningkatkan respon imunitas, memperbaiki kualitas air, dan berinteraksi dengan fitoplankton (Verschuere dkk. 2000; Balcázar dkk. 2006). Peran dari probiotik yang digunakan dalam akuakultur dapat berupa agen pencegahan (*preventive*) (Rengpipat dkk. 2000; Verschuere dkk. 2000) maupun sebagai agen terapi (*curative*) (Cunningham-Rundles dkk. 2000; Marteau dkk. 2001; Isolauri dkk. 2002; Lisal 2005).

Beberapa syarat penting yang harus dipenuhi bakteri probiotik dalam akuakultur antara lain: (1) tidak bersifat patogen atau mengganggu inang, (2) tidak bersifat patogen terhadap konsumen (3) tidak mengganggu keseimbangan ekosistem setempat, (4) mikroorganisme tersebut harus mudah diperoleh, dipelihara, dan diperbanyak (5) dapat hidup, bertahan serta berkembang biak di dalam saluran pencernaan inangnya (6) mampu hidup pada kisaran pH luas pada inangnya (7) dapat dipelihara dalam media yang memungkinkan untuk diintroduksi ke dalam saluran pencernaan inang (8) dapat hidup dan berkembang di dalam wadah pemeliharaan ikan (9) dapat disiapkan sebagai produk sel hidup pada skala industri (10) dapat terjaga kemampuannya dan dapat bertahan untuk waktu simpan yang lama pada penyimpanan maupun di lapangan (Verschuere dkk. 2000; Feliatra dkk. 2004). Feliatra dkk. (2004) menyatakan bahwa peluang bakteri yang dapat

dijadikan sebagai bakteri probiotik dan memenuhi 10 prasyarat dasar menjadi probiotik adalah bakteri lokal yang diperoleh dari lingkungan dimana kegiatan budidaya dilakukan. Bakteri lokal tersebut akan lebih efektif dan efisien karena telah teradaptasi dengan lingkungan sekitarnya, sehingga mudah dalam pemeliharannya (Irianto 2003).

Bakteri yang sering digunakan sebagai probiotik dalam akuakultur banyak didominasi oleh bakteri asam laktat (BAL) (Gullian dkk. 2004), namun saat ini beberapa bakteri dari genus *Bacillus*, *Vibrio*, *Pseudomonas* dan *Micrococcus* sudah banyak digunakan (Verschuere dkk. 2000 & Geovanny dkk. 2007). Pertimbangan penggunaan bakteri dari genus lainnya didasarkan pada kemampuan bakteri tersebut berperan sebagai probiotik dan memenuhi kriteria dasar probiotik (Feliatra dkk. 2004). Bakteri dari genus *Bacillus* dan *Micrococcus* seperti *Bacillus subtilis*, dan *Micrococcus luteus* memiliki toleransi yang baik terhadap panas, derajat keasaman, dan kadar garam, bahkan *Bacillus* juga mampu membentuk spora (Holt dkk. 1994). Kondisi tersebut sangat membantu dalam pemeliharaan bakteri tersebut maupun penyimpanan untuk jangka waktu lama (Irianto 2003; Feliatra dkk. 2004).

Probiotik yang digunakan dalam akuakultur hingga saat ini masih sebagai agen pencegahan (*preventive agent*), bukan sebagai agen terapi (*curative agent*) (Rengpipat dkk. 2000; Verschuere dkk. 2000). Bukti penggunaan probiotik sebagai agen pencegah dinyatakan oleh Gatesoupe (1999) dan Griffith (1995) yang berhasil mengisolasi bakteri *Vibrio*

*alginolyticus* dari air laut yang mampu meningkatkan kelangsungan hidup larva udang pada *hatchery* di Ekuador. Penggunaan probiotik tersebut dapat mempersingkat masa istirahat operasional *hatchery* dari 7 hari menjadi kurang dari 2 hari per bulan, volume produksi larva udang meningkat 35%, dan penggunaan antibiotik menurun hingga 94%.

Verschuere dkk. (2000), melaporkan hasil penelitian yang dilakukan oleh Sugama dan Tsumura pada tahun 1998, yang telah berhasil meningkatkan kelangsungan hidup larva udang windu (*P. monodon*) menjadi 46,1% dibandingkan dengan kontrol (tanpa penambahan bakteri) sebesar 10,6%. Bakteri diberikan dengan cara menginokulasikan bakteri *Flavimonas* (BY-9) dengan densitas  $10^6$  cfu/ml pada wadah pemeliharaan larva volume 18 m<sup>3</sup> setiap hari hingga menjelang panen.

Rengpipat dkk. (2003) melaporkan bahwa bakteri *Bacillus subtilis* BT23 yang ditambahkan ke dalam media pemeliharaan udang windu dengan dosis  $10^6$ /ml per harinya, mampu meningkatkan pertumbuhan 2 kali lebih baik dibanding dengan kontrol (tanpa penambahan bakteri) dan meningkatkan resistensi terhadap bakteri patogen *Vibrio harveyi*.

Keberhasilan meningkatkan kelangsungan hidup larva udang tersebut diduga karena probiotik mempengaruhi komposisi flora mikroorganisme melalui kompetisi tempat, energi, nutrisi, menghasilkan komponen penghambat, dan meningkatkan respon imunitas udang (Verschuere dkk. 2000; Geovanny dkk. 2007).

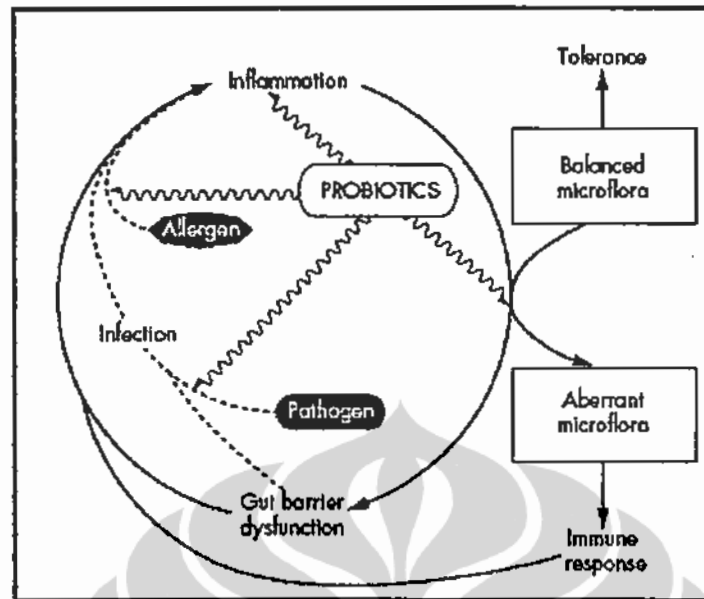
Penggunaan probiotik sebagai agen pencegah dalam akuakultur, memberikan konsekuensi logis di lapangan yaitu probiotik harus diberikan secara rutin sejak pemeliharaan udang di mulai hingga menjelang panen, sehingga akan meningkatkan biaya produksi pemeliharaan udang. Peningkatan biaya produksi, akan berdampak terhadap margin keuntungan usaha pemeliharaan udang tersebut.

Aplikasi probiotik dalam akuakultur sebagai agen terapi (*curative*) hingga saat ini belum dilaporkan, namun beberapa bukti kuat probiotik dapat digunakan sebagai terapi telah terdokumentasikan dengan baik untuk kesehatan manusia dan hewan terestrial dapat dijadikan bahan pertimbangan untuk dilakukan dalam akuakultur. Cunningham-Rundles dkk. (2000), Marteau dkk. (2001), Isolauri dkk. (2002), dan Lisal (2005) menyatakan bahwa bakteri *Lactobacilli* dan *Bifidobacteria* dapat digunakan untuk terapi beberapa gangguan penyakit *metabolisme* yaitu penyakit pada organ lambung dan saluran pencernaan. Gangguan penyakit yang dapat diobati oleh probiotik tersebut di antaranya: *lactose maldigestion*, *antibiotic-associated diarrhea* (diare akibat penggunaan antibiotik), *inflammatory bowel disease* (radang lambung), dan *gastroenteritis* yang banyak diakibatkan oleh infeksi *rotavirus*.

De Vrese & Marteau (2007) menyatakan bahwa bakteri probiotik *Lactobacillus rhamnosus* GG, *L. reuteri*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *Eschericia coli* strain Nissle 1917, *Bifidobacteria*, *Enterococcus faecium* SF68, dan kamir (*yeast*) *Saccharomyces boulardii* banyak digunakan sebagai agen terapi

(*medicinal use*) pada gangguan saluran pencernaan, baik dalam bentuk tunggal maupun campuran. Dinkci dkk. (2006), selanjutnya melaporkan bahwa, *Bifidobacterium animalis* BB-12 dan *Lactobacillus* GG dapat menyembuhkan penyakit radang karena alergi (*allergic inflammation*) disertai dengan eksim (*atopic eczema*). Crane (2002) mendokumentasikan bahwa *Lactobacillus* GG, juga dapat menekan sekitar 50% pasien penderita eksim (*atopic eczema*), pilek (*allergic rhinitis*), atau asma (*asthma*). Laporan lain, juga menyatakan bahwa bakteri probiotik dapat digunakan sebagai terapi pada bayi penderita HIV (*Human immunodeficiency virus*) (Gordon 2008) yang belum mampu menerima obat-obatan yang terbuat dari zat-zat kimia. Terapi probiotik tersebut diberikan melalui air susu ibu (ASI).

Gambaran secara umum model mekanisme probiotik sebagai agen terapi digambarkan oleh Isolauri dkk. (2002). Meskipun secara skema tidak langsung berhubungan dengan udang, namun skema yang dikembangkan menyatakan bahwa bakteri probiotik secara umum bekerja menghambat proses infeksi melalui peningkatan respon imunitas, degradasi antigen, meningkatkan kestabilan mikrofola serta menekan patogen (Gambar II.4).



**Gambar II.4.** Skema model kerja dari probiotik saat terjadinya serangan penyakit. Garis spiral menunjukkan aktivitas penghambatan, garis putus-putus menunjukkan aktivitas yang bersifat mempercepat proses, garis utuh menunjukkan alur hubungan dari proses yang terjadi [sumber: Isolauri dkk. 2002].

Keberhasilan probiotik untuk terapi terhadap penyakit yang disebabkan oleh serangan virus, diduga karena salah satu mekanisme kerja probiotik, yaitu meningkatkan respon imunitas atau sistem kekebalan tubuh (Verschuere dkk. 2000). Sistem pertahanan/kekebalan tubuh merupakan suatu mekanisme fisiologis yang membantu tubuh hewan/organisme untuk mengenali benda-benda asing terhadap dirinya dan untuk menetralisasi, mengeliminasi atau memetabolisme benda-benda asing tersebut walaupun dengan atau tanpa adanya perlukaan terhadap jaringan tubuhnya (Bellanti 1978). Sistem tersebut terbagi menjadi dua, yaitu sistem pertahanan spesifik dan sistem pertahanan non spesifik. Sistem pertahanan spesifik adalah

respon pengenalan dan pengawasan yang ketat terhadap benda asing dengan kepekaan tinggi, respon tersebut akan bereaksi dengan benda-benda identik atau sama dengan benda-benda terdahulu yang memulai respon, sedangkan sistem pertahanan non spesifik, yaitu respon yang terjadi sesudah pemaparan inisial dari benda asing, dan tidak tergantung pada pengenalan spesifik.

Udang memiliki sistem pertahanan non spesifik yang lebih berperan daripada sistem pertahanan spesifik (Söderhäll & Cerenius, 1992). Sistem pertahanan non spesifik pada tubuh udang terbagi menjadi dua macam, yaitu sistem pertahanan selular dan sistem pertahanan humoral (Söderhäll & Cerenius, 1992). Sistem pertahanan selular meliputi aktivitas fagositosis oleh hemosit (sel darah udang), nodulasi dan enkapsulasi. Sementara sistem pertahanan humoral terdiri dari *prophenoloxidase (proPO)*, *phenoloxidase (PO)*, *lectin* dan *agglutinin*. Sistem pertahanan humoral berasal dari suatu tempat khusus yang terjadi dalam tanggap kebal selular, yaitu sekresi selular, fragmentasi atau perubahan biokimiawi menjadi bakteriostatik, lisis atau bahan-bahan lain pada cairan tubuh (*humor*) (Johansson dkk. 2000).

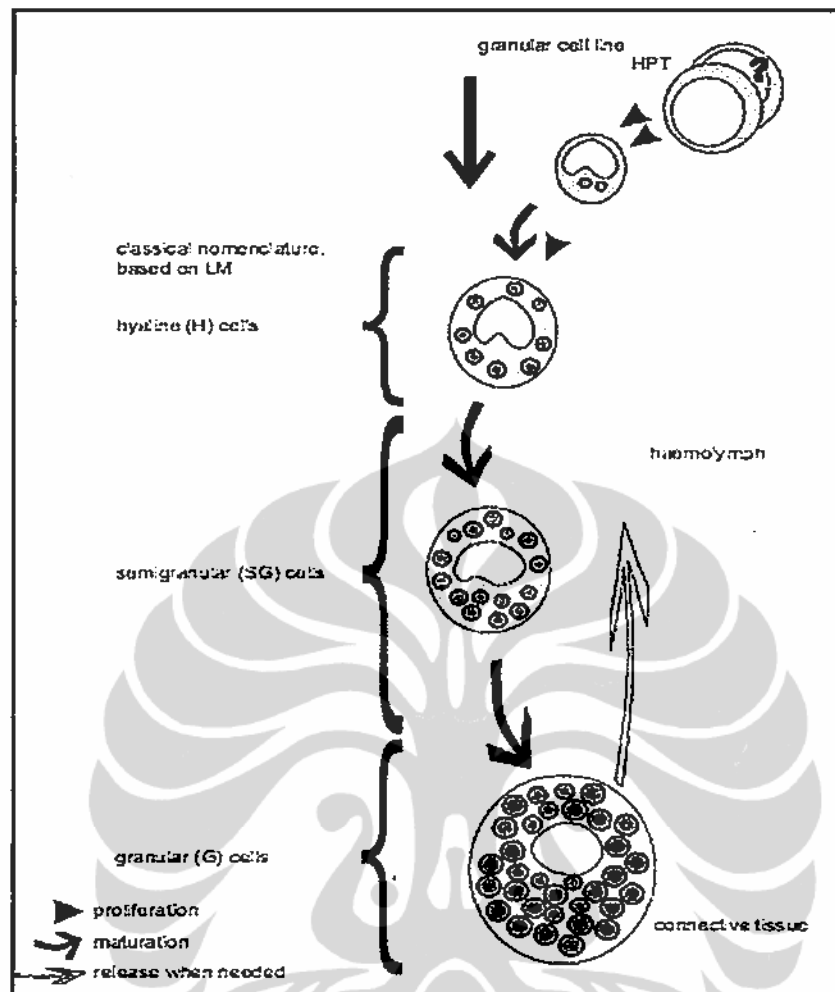
Secara umum, hemosit mempunyai tiga tipe, yaitu sel *hyalin*, sel *semigranular* dan sel *granular* (Supamattaya dkk. 1998; Johansson dkk. 2000). Sel-sel *hyalin* tidak memiliki *granul* dan berfungsi dalam fagositosis. Sel-sel *semigranular* merupakan peralihan antara sel-sel *hyalin* dengan sel-sel *granular* dan mempunyai sedikit *granul* dan berukuran lebih besar daripada sel-sel *hyalin* (Gambar II.5).



**Gambar II.5.** Sel darah udang normal tanpa fagosit. H: sel *hyalin*, S: sel semigranular, L: sel granular [sumber: Supamattaya 1998]

Van de Braak (2002) menyatakan bahwa sel *hyalin* akan berkembang menjadi sel semigranular. Sel tersebut kemudian bergerak menuju *connective tissue* hingga menjadi sel granular. Jika terjadi gangguan berupa stres, atau serangan penyakit, sel granular tersebut dapat kembali ke *haemolymph* untuk mengantisipasi gangguan (Gambar II.6).



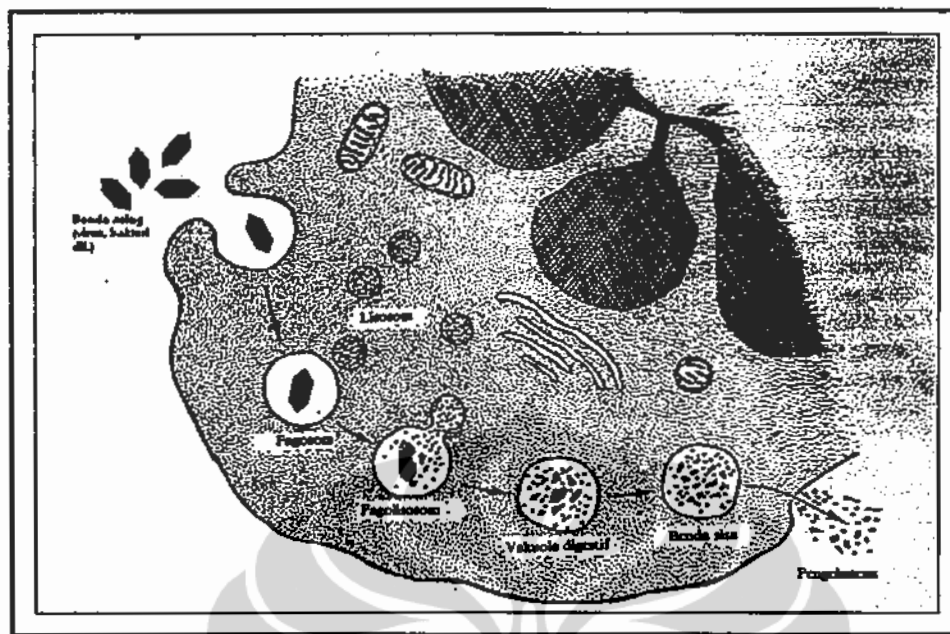


**Gambar II.6.** Gambaran perkembangan sel darah udang dan model reaksi terhadap gangguan dari luar (stres/penyakit). HTP: *haematopoietic tissue*. [sumber: Van de Braak 2002].

Sel-sel *semigranular* tersebut memiliki beberapa kemampuan di antaranya dalam fagositosis walaupun dengan kemampuan kecil, enkapsulasi, nodulasi dan memiliki kandungan *prophenoloxidase (proPO)*. Pada tahun 1998, Martin & Graves (*lihat* Batubara 1998) menyatakan bahwa sel-sel *granular* memiliki granul yang besar dan merupakan tempat penyimpanan utama *proPO* serta mempunyai protein yang dikenal dengan

faktor 76 kDa (Bellanti, 1993). Komposisi *hyalin* hanya 5-10% dari total sirkulasi hemosit, *semi granular*  $\pm$  75%, sedangkan *granular*  $\pm$  20%.

Pada sistem pertahanan selular, aktivitas dari hemosit mempunyai fungsi yang sangat penting. Sel-sel fagositik ini berfungsi untuk melakukan fagositosis terhadap benda asing yang masuk ke dalam tubuh inang. Ketahanan tubuh yang meningkat dapat diketahui dari meningkatnya aktivitas sel-sel fagositik hemositnya (Supamattaya dkk. 1998). Fagositosis tersebut menjadi penting karena berperan dalam hampir semua proses pembersihan dan penghancuran mikroorganisme asing secara intraselular. Skema proses fagositosis secara umum pada manusia, hewan terestrial termasuk ikan dan udang dinyatakan oleh Bellanti (1993) (Gambar II.7). Proses fagositosis merupakan upaya multifase yang memerlukan langkah-langkah yaitu: pengenalan (*recognition*) dari benda asing yang akan dicerna, gerakan ke arah obyek (kemotaksis), perlekatan, penelanan (*ingestion*) dan selanjutnya pencernaan (*digestion*) intra-selular oleh mekanisme-mekanisme antimikroba.



**Gambar II.7.** Gambaran secara skematis proses fagositosis pada organisme dengan sistem kekebalan non spesifik [sumber: Belanti 1993 yang telah dimodifikasi]

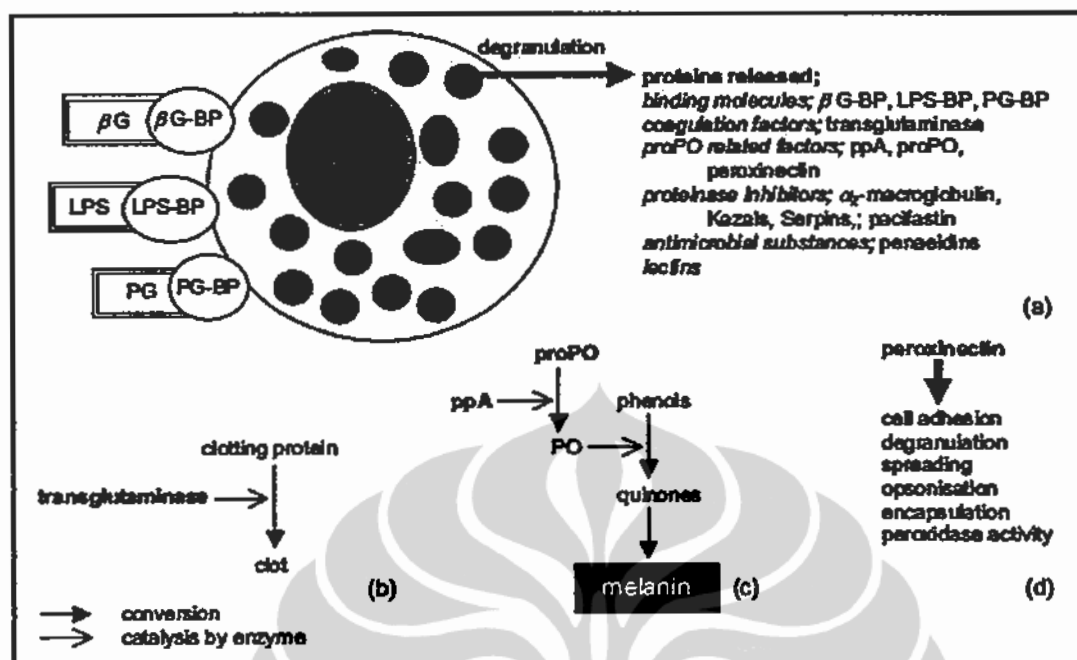
Fagosit sendiri tidak cukup untuk memusnahkan sejumlah besar benda asing yang ditemuinya dan belum diketahui secara pasti apakah ada faktor-faktor opsonin atau faktor-faktor kemotaktik yang ikut serta dalam mekanisme pemusnahan tersebut (Söderhäll dkk. 1998 *lihat* Rukmi, 1999). Supamattaya dkk. (1998) dan Söderhäll & Cerenius (1992) menyatakan bahwa aktivitas fagositik dari sel-sel *hyalin* dapat meningkat dengan adanya faktor-faktor opsonin yang ada dalam hemosit. Faktor-faktor tersebut hanya dapat muncul dengan diaktifkannya sistem *prophenoloxidase* (*proPO*).

Söderhäll & Cerenius (1992) dan Johansson dkk. (2000) menyatakan bahwa sistem *proPO* yang terdapat di dalam sel-sel *semigranular* dan sel-sel *granular* merupakan suatu proenzim yang tidak aktif. Sistem *proPO* harus

diubah terlebih dahulu menjadi bentuk aktifnya, yaitu *phenoloxidase (PO)* agar dapat bereaksi terhadap patogen. Söderhäll & Cerenius (1992) menyatakan bahwa enzim *PO* berperan mengoksidasi *phenol* menjadi *quinon*, disertai polimerisasi secara non enzimatis membentuk melanin yang bersifat bakteristatik. Reaksi melanisasi yang bersifat pertahanan selular ini meliputi proses fagositosis, formasi nodul, enkapsulasi dan aktivitas sel-sel darah (hemosit) lainnya.

Supamattaya dkk. (1998), dan Johansson dkk. (2000) menjelaskan bahwa mekanisme enzimatik dari sistem *proPO* menjadi *PO* diawali dengan terjadinya infeksi oleh benda-benda asing pada sel-sel tubuh udang. Sel-sel *semigranular* yang pertama kali mengenali benda-benda asing tersebut. Benda-benda asing tersebut dapat berupa polisakarida, lipopolisakarida, peptidoglikan ataupun bakteri probiotik. Selain itu, sistem *proPO* juga dapat diaktifkan oleh konsentrasi ion kalsium yang rendah di dalam tubuhnya (Supamattaya dkk. 1998).

Mekanisme secara umum sistem pertahanan yang terjadi dalam tubuh udang (Gambar II.8) digambarkan oleh Van de Braak (2002). Mekanisme tersebut tersebut diawali dengan pelepasan beberapa protein oleh hemosit udang yang bertindak sebagai proenzim and substrat. Protein tersebut terlibat dalam proses penggumpalan (*clotting*), pengaktifkan sistem *prophenoloxidase (proPO)*, dan proses selular lainnya.



**Gambar 11.8.** Skema mekanisme pertahanan selular dalam hemosit udang. (a) Hemosit mengalami *degranule* (pecah menjadi partikel kecil) dan melepas protein. (b) Beberapa protein terlibat dalam penggumpalan (*clotting*). (c) pengaktifan *proPO*. (d) Pengaktifan sistem atau proses selular lainnya.  $\beta$ G-BP: *beta glucan binding protein*, LPS-BP: *lipopolysaccharide binding protein*, PG-BP: *peptidoglycan binding protein*, PO: *phenoloxidase*, ppA: *prophenoloxiade activating enzyme*, proPO: *prophenoloxidase*. [sumber: Van de Braak 2002]

Berdasarkan kondisi di atas, yang menyatakan bahwa penggunaan probiotik yang berperan sebagai agen pencegah akan meningkatkan biaya produksi pemeliharaan udang, dan berdasarkan penelitian, yang membuktikan bahwa probiotik dapat digunakan sebagai agen terapi (*curative*), terhadap penyakit yang disebabkan oleh bakteri termasuk virus, serta belum adanya penggunaan bakteri probiotik sebagai agen terapi pada

udang, maka dapat diharapkan bahwa bakteri probiotik dapat dimanfaatkan sebagai agen terapi pada udang vannamei untuk menanggulangi serangan WSSV.

Pada studi pendahuluan, diperoleh 71 isolat bakteri lokal hasil skrining yang memiliki potensi sebagai probiotik pada udang vannamei. Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan tingkat kelangsungan hidup udang lebih baik dibandingkan dengan kontrol ketika diuji terhadap *post larva* (PL) udang vannamei (lihat Makalah I). Tujuan dari penelitian ini adalah melakukan seleksi terhadap isolat bakteri lokal terpilih hasil skrining yang dapat digunakan sebagai terapi untuk menanggulangi WSSV pada udang vannamei.

## **BAHAN DAN METODE**

### **BAHAN**

#### **Isolat bakteri**

Isolat bakteri yang digunakan sebagai bahan uji terhadap udang yang terinfeksi WSSV adalah sejumlah 71 isolat, yang berasal dari daerah Serang, Tangerang, Pandeglang dan Karawang.

#### **Udang sebagai hewan penelitian**

Udang yang digunakan selama penelitian adalah udang vannamei (*Litopenaeus vannamei*) yang diperoleh dari unit pembenihan udang komersil

(PT. Tri Windu Sakti Manunggal) yang berada di daerah Anyer, Kabupaten Pandeglang. Udang tersebut stadium PL<sub>10</sub>, dan bebas penyakit WSSV (*specific pathogen free*, SPF-WSSV).

### **Air laut**

Air laut yang dipakai selama penelitian adalah air laut yang diperoleh dari Perairan Ancol (Jakarta Utara), diambil dari jarak 1000 m dari pantai pada kedalaman 2-3 m dari permukaan. Salinitas air laut berkisar 25-30 ppt.

### **Media kultur dan bahan kimia**

Media dan bahan kimia yang digunakan selama penelitian adalah: *marine agar* (Difco 2216), NaCl (Merck), alkohol, akuades, kapas, *bleech (liquid)*, *natriumthiosulphate*, spirtus, mikro tip, mikrotube 1,5 ml, 0,2 ml (Eppendorf) dan air laut.

### **Peralatan yang digunakan**

Alat yang digunakan selama penelitian adalah: *laminar air flow cabinet* (Makita), *micro refrigerator centrifuge* (Eppendorf 5514R), *vortex* (Genie 2), *Incubator* (Heraeus), *oven* (Heraeus) autoklaf (Hirayama), mikroskop (Olympus) mikro pipet (Eppendorf; 1000  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 10  $\mu$ L), Jarum ose, *Spatel drygalsky*, *refrigerator* (Samsung), *spectrofotometer* (Genesys 11), *refractometer* (Atago-90), pengukur kualitas air: DO, temperatur, pH (Hanna instrument model H19143); *amonium test kit* (Merck), *nitrit test kit* (Merck),

amoniak *testkit* (Merck), nitrat test kit (Merck), termometer, dan *glass ware* dan peralatan yang umum digunakan di laboratorium mikrobiologi.

## **METODE**

### **Pemeliharaan Isolat bakteri**

Isolat-isolat bakteri dipelihara dalam media agar miring *Marine Agar* dan disimpan pada suhu 4-10° C untuk *original culture*, *stock culture* dan *working culture*. Selanjutnya bakteri ditumbuhkan pada medium *triptic soy broth* (TSB) dan diinkubasi selama 24 jam (suhu 30° C) saat akan digunakan uji efikasi terhadap WSSV.

### **Penentuan konsentrasi bakteri**

Konsentrasi bakteri yang digunakan selama penelitian adalah 10<sup>6</sup>/ml, berdasarkan uji pendahuluan (lihat Makalah I) menggunakan spektrofotometer.

### **Persiapan air laut**

Air laut yang akan digunakan, terlebih dahulu disterilkan dengan menambahkan *chlorine* 100 mg/l kemudian diaerasi selama 6 jam, dan selanjutnya dinetralisir dengan *natriumthiosulphate*, dosis 50 mg/l.



### **Aklimatisasi udang**

Udang stadium PL<sub>10</sub> yang diperoleh dari *hatchery*, diaklimatisasi dalam bak semen dengan dimensi 4mx2mx1,5m, yang diisi air laut dengan salinitas 25-30 ppt. Air laut tersebut terlebih dahulu didesinfeksi menggunakan *chlorine* 100 mg/l selama 6 jam. Bak tersebut dilengkapi dengan aerator (*Hi-blow aerator* 100 watt) dan ditutup terpal berwarna gelap untuk menjaga suhu air 29-31° C tetap stabil. Udang dipelihara selama dua bulan agar diperoleh ukuran juvenil (3-5 g/ekor) dengan empat kali pemberian pakan per hari dan dosis 2% dari berat total. Pergantian air dilakukan dua minggu sekali sebanyak 5% menggunakan air laut yang telah didesinfeksi dengan *chlorine* 100 mg/l untuk menghindari kontaminasi dari luar.

### **Pemeriksaan WSSV dari udang sumber inokulum**

Udang sebagai sumber inokulum WSSV yang diperoleh dari Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara, terlebih dahulu di uji untuk mengetahui infeksi positif WSSV dengan metode PCR berdasarkan Kimura dkk. (1996). Primer yang digunakan adalah primer spesifik WSSV hasil restriksi enzim *EcoRI* dari organisme *shrimp white spot syndrome virus*, yaitu 211F (5'-ACT ACT AAC TTC AGC CTA TCT AG-3') dan 1174R (5'- TAA TGC GGG TGT AAT GTT CTT ACG A-3').

Campuran reaksi PCR terdiri dari primer 211F dan 1174R (konsentrasi 20µM) masing-masing 1 µl, *Ready To Go* (RTG) yang telah dilarutkan dalam

12,5 µl *SuperMix*, 8,5 ddH<sub>2</sub>O dan *template DNA* 2 µl. Proses amplifikasi menggunakan PCR T personal Tecra. Kondisi PCR terdiri dari denaturasi awal pada suhu 94° C selama 2 menit sebanyak satu siklus, diikuti dengan denaturasi 94° C selama 30 detik; *annealing*, 55° C selama 30 detik; ekstensi 72° C selama 90 detik, sebanyak 30 siklus dan ekstensi akhir 72° C selama 5 menit.

Produk PCR selanjutnya di-elektroforesis dengan gel *Agarose* 1% dan *buffer* TAE 1X pada *voltase* 100 volt selama 25 menit. Gel *agarose* selanjutnya direndam dalam larutan *Ethidium Bromide* (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>Br) selama 10 menit. Visualisasi produk PCR menggunakan *Ultra Violet (UV) transilluminator* (Lo dkk. 1996; Lightner 1996). DNA marker (100 pb) digunakan sebagai penanda ukuran DNA. Pembacaan hasil elektroforesis dengan membandingkan pita dengan kontrol positif WSSV pada pasangan basa 982.

#### **Pembuatan larutan stok WSSV**

Pembuatan larutan stok WSSV berdasarkan Hameed dkk. (1998). Jaringan tubuh udang dari bagian *abdomen* yang positif terinfeksi WSSV sebanyak 50 gram digerus hingga halus dan disuspensikan dengan air laut steril 2 ppt dengan pengenceran 10% (w/v), kemudian disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 3000 rpm pada suhu 4° C. Selanjutnya supernatan disentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 8000 rpm pada suhu 4° C. Supernatan kemudian disaring dengan membran filter *millipore*

(Whatman) dengan ukuran pori 0,2  $\mu\text{m}$ . Hasil penyaringan merupakan larutan stok virus WSS dan disimpan pada suhu  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### **Penentuan $\text{LD}_{50}$ melalui perendaman**

Penentuan *lethal dose* 50 ( $\text{LD}_{50}$ ) berdasarkan Hamsah (2004).

Larutan stok virus WSS diencerkan secara berseri hingga pengenceran  $10^{-7}$  untuk mendapatkan konsentrasi yang mengindikasikan mortalitas udang 50%. Udang stadium juvenil (3-5 gram/ekor) digunakan sebagai hewan uji selama penelitian. Udang tersebut direndam ke dalam air yang telah ditambahkan larutan stok WSSV sesuai pengencerannya selama 3 jam. Setelah udang direndam, selanjutnya dipindahkan ke dalam air laut baru dengan densitas 16 ekor per wadah (toples) untuk pengamatan hingga mencapai kematian udang 50%. Pengujian menggunakan metode PCR digunakan untuk mengetahui udang terinfeksi WSSV pada masing-masing konsentrasi pengenceran. Konsentrasi pengenceran dengan mortalitas 50%, digunakan sebagai dosis infeksi pada uji efikasi kandidat bakteri probiotik lokal terhadap WSSV.

## **Seleksi bakteri probiotik lokal berdasarkan kemampuan terapi pada udang vannamei yang terinfeksi WSSV**

- **Persiapan wadah dan perlakuan untuk seleksi**

Udang SPF (*specific pathogen free*) yang telah diaklimatisasikan selama 2 bulan direndam (*short dipping*) berdasarkan Chang dkk. (1999) dan Hamsah (2004) selama 3 jam dalam larutan stok WSSV yang telah diencerkan berdasarkan hasil penentuan LD<sub>50</sub>. Udang selanjutnya dimasukkan ke dalam wadah penelitian sejumlah 16 ekor per wadah, dengan volume 4 liter air laut yang telah didesinfeksi dengan *chlorine* 100 mg/l dan telah dikondisikan dengan perlakuan kandidat probiotik yaitu 71 isolat bakteri lokal terpilih dengan konsentrasi 10<sup>6</sup>/ml (lihat Makalah I). Selama penelitian, udang diberi pakan berupa pellet dengan frekuensi pemberian 4 kali per hari dengan dosis 2% (w/w) dari total biomas.

- **Perlakuan kontrol penelitian**

Perlakuan kontrol dilakukan, yaitu tanpa pemberian bakteri kandidat probiotik, namun udang diinfeksi dengan virus WSS. Tujuan dari perlakuan kontrol adalah mengetahui efektifitas dari kandidat probiotik yang diuji. Selama penelitian, udang diberi pakan berupa pellet dengan frekuensi pemberian 4 kali per hari dengan dosis 2% (w/w) dari total biomas.

- **Pengukuran kualitas air**

Pengukuran terhadap parameter kualitas air dilakukan selama penelitian. Parameter yang diukur meliputi: temperatur air, pH, oksigen terlarut, nitrit dan nitrat dengan menggunakan peralatan standar yang biasa dipergunakan di laboratorium.

- **Pengukuran parameter kesehatan udang dan total bakteri**

Pada akhir penelitian, dilakukan pengukuran terhadap beberapa parameter kesehatan udang di antaranya: kelangsungan hidup udang (Nejad dkk. 2004), indeks imunitas, yaitu aktivitas fagosit udang dan total hemosit udang (Rengpipat dkk. 2000), histopatologi organ tertentu udang (Lightner, 1996; Hamsah, 2004), dan deteksi WSSV menggunakan metode PCR (Magbanua dkk. 2000) serta total bakteri dari media (air) penelitian. Penentuan total bakteri, dilakukan melalui pengenceran berseri menggunakan larutan *saline* 0,85%, dilanjutkan dengan *plating* pada media agar (*marine agar*; Difco 2216; 55,1g/l). Perhitungan total bakteri dilakukan setelah media 'agar' diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30° C dengan metode satuan pembentukan koloni/CFU, yaitu: jumlah rata-rata koloni bakteri dibagi dengan volume inokulasi dikali pengenceran seri yang digunakan (Alavandi & Purnima, 2004).

### Pengambilan darah (*haemolymph*) udang

*Haemolymph* udang diambil dari bagian *sinus ventralis* yang terletak pada segmen kedua dari badan udang (Gambar II.9) dengan menggunakan *syringe* 1 ml yang telah diberi antikoagulan (*sodium citrate* 3,8%) dengan perbandingan 1 bagian antikoagulan untuk 3 bagian darah (Lightner 1996).



Gambar II.9. Pengambilan *haemolymph* udang *vannamei* dari bagian *ventral* pada segmen kedua badan udang [sumber: Van de Braak 2002]

### Total hemosit

Sebanyak 0,1 ml *haemolymph* yang telah diberi *sodium citrate* 3,8% untuk mencegah terjadinya pembekuan dengan perbandingan 1 bagian antikoagulan untuk 3 bagian darah, diaduk perlahan hingga merata.

*Haemolymph* selanjutnya diambil dengan pipet sebanyak satu tetes, dimasukkan ke dalam *haemocytometer* untuk dihitung jumlah total hemositnya ( $\text{sel}/\text{mm}^3$ ), menggunakan mikroskop pada perbesaran 400 kali (Lightner 1996).

### Aktivitas fagositosis

Aktivitas fagosit diobservasi berdasarkan Rengpipat dkk. (2000). Sebanyak 0,1 ml *haemolymph* dimasukkan ke dalam tabung mikro 0,5 ml, dan ditambahkan 0,1 ml *Staphylococcus aureus* ( $1 \times 10^7$ /ml), dan diinkubasikan selama 20 menit pada suhu kamar ( $28^\circ \text{C}$ ) agar terjadi proses fagosit. Kemudian diambil beberapa tetes ke dalam gelas objek, dibuat ulasan dan dikeringudarakan. Selanjutnya difiksasi dengan methanol 100% selama 15 menit dan diwarnai dengan *Giemsa* 10% selama 15 menit, dicuci dengan air kran mengalir dan kembali dikeringkan sebelum dilakukan pengamatan dengan mikroskop. Aktivitas fagosit udang diukur berdasarkan pengamatan terhadap 100 sel yang diamati dengan cara menghitung persentase hemosit yang memfagosit dan hemosit yang tidak memfagosit.

### Histopatologi

Histopatologi organ udang diobservasi berdasarkan Lightner (1996). Target organ berupa insang dan hepatopankreas dari masing-masing perlakuan dan kontrol (organ udang yang tidak ditambahkan bakteri kandidat probiotik) terlebih dahulu difiksasi dengan menggunakan fiksatif Davidson selama 24 jam. Sampel selanjutnya dicuci dengan menggunakan alkohol 70%. Kemudian dilanjutkan pada tahapan berikutnya, yaitu: dehidrasi menggunakan *tissue processor*, penanaman (*embedding*) dalam *paraffin*,

*blocking* dengan mendinginkan *paraffin*, pemotongan dengan mikrotom, *staining/pewarnaan* H&E, *mounting* serta pengamatan dengan menggunakan mikroskop pada pembesaran 400 kali hingga 1000 kali.

### Deteksi infeksi WSSV

Deteksi infeksi WSSV dilakukan di laboratorium biologi molekular, Pusat Riset Perikanan Budidaya, Departemen Kelautan dan Perikanan dengan metode PCR, berdasarkan prosedur Lo dkk. (1996), menggunakan IQ2000™ WSSV *Instruction Manual*. Satu buah kaki renang (*pleopod*) udang yang hampir mati (*moribund*) dari sample yang diambil secara acak dari perlakuan kandidat probiotik dan kontrol (tanpa penambahan bakteri) dianalisis menggunakan primer spesifik WSSV hasil restriksi enzim *SalI* dari sekuen klon DNA WSBV (*White spot baculovirus*) pada 1461 pb. Primer berasal dari organisme *shrimp white spot syndrome virus*. Urutan basa primer tersebut yaitu untuk *step* pertama PCR: 146F1 (5'-ACT ACT AAC TTC AGC CTA TCT AG-3') dan 146R1 (5'-TAA TGC GGG TGT AAT GTT CTT ACG A-3'), dan *step* kedua PCR: 146F2 (5'-GTA ACT GCC CCT TCC ATC TCC A-3') dan 146R2 (5'-TAC GCC AGC TGC TGC ACC TTG T-3') (Lo dkk. 1996). Amplifikasi WSSV spesifik dari reaksi ini adalah 1447 pb untuk *first* PCR dan 941 pb untuk *Nested* PCR.

Campuran reaksi PCR terdiri dari *first* PCR *preMix* sebanyak 7,5 µl dan 0,5 µl *iqzyme* DNA *Polymerase* untuk *first* PCR, dan *Nested* PCR *PreMix* sebanyak 14 µl dan 1 µl *iqzyme* DNA *Polymerase* untuk *nested* PCR.



Reaksi PCR yang pertama adalah menambahkan 2 µl *template* DNA ke dalam campuran reaksi *first* PCR, selanjutnya dilakukan proses PCR dengan kondisi PCR: 94°C 2 menit, kemudian 94° C 20 detik; 62° C 20 detik; 72° C 30 detik, diulang 15 siklus, kemudian 72° C 30 detik dan 20° C 30 detik.

Setelah selesai proses *first* PCR selanjutnya tambahkan campuran *nested* PCR dan dilanjutkan pada proses PCR dengan kondisi PCR: 94° C 20 detik; 62° C 20 detik; 72° C 30 detik, diulang 30 siklus, kemudian ditambah 72° C 30 detik, dan 20° C 30 detik.

Produk PCR selanjutnya di-elektroforesis dengan gel *Agarose* 1% dan *buffer* TAE 1X pada *voltase* 100 *volt* selama 25 menit. Gel *agarose* selanjutnya direndam dalam larutan *Ethidium Bromide* (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>Br) selama 10 menit. Visualisasi produk PCR menggunakan *Ultra Violet (UV) transilluminator* (Lightner 1996). DNA marker (100 pb) digunakan sebagai penanda ukuran DNA. Pembacaan hasil elektroforesis dilakukan dengan membandingkan pita pada gel *agarose* dengan kontrol positif WSSV yang terletak pada 296 dan 550 pasangan basa dan kontrol negatif WSSV yang terletak pada 848 pasangan basa. Primer spesifik dari udang *Penaeus aztecus* digunakan sebagai kontrol negatif WSSV untuk memonitor kontaminasi DNA pada udang. Urutan primer tersebut yaitu: 143F (5'-TGCCTTATCAGCTNTCGATTGTAG-3') dan 145r (5'-TTCAGNTTTGCAACCATACTTCCC-3'), dimana N mewakili G, A, T atau C. DNA tersebut terletak pada urutan pasangan basa 352 – 1200 dari 18S rRNA udang *Penaeus aztecus*.

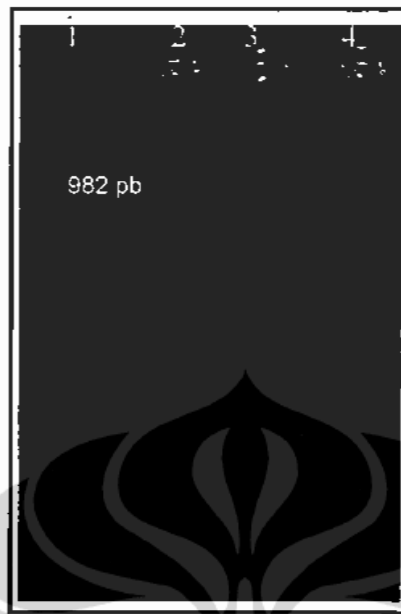
## **Analisis statistik**

Data kelangsungan hidup udang, aktivitas fagosit udang dan total hemosit udang, dianalisis dengan *analysis of variance (Anova)* dan dilanjutkan dengan uji pembandingan berganda *Dunnet* (kepercayaan 95%), jika terjadi perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ ). Data kelangsungan hidup, aktifitas fagosit dan hemosit udang tersebut di atas dianalisis dengan menggunakan program komputer SPSS versi 13,0.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Penentuan LD<sub>50</sub>**

Hasil pengecekan dengan metode PCR terhadap udang yang digunakan sebagai inokulum menunjukkan positif terinfeksi WSSV, ditunjukkan dengan indikasi pita pada visualisasi gel agarose pada 982 pasangan basa (Gambar II.10). Hal tersebut mengindikasikan bahwa udang dapat digunakan sebagai sumber bahan untuk membuat inokulum WSSV, yang akan digunakan untuk seleksi kandidat bakteri probiotik berdasarkan kemampuan terapi terhadap WSSV.



**Gambar II.10.** Hasil elektroforesis produk PCR sampel udang bahan inokulum WSSV yang diambil dari kaki renang udang. Keterangan: 1: marker DNA, 2: sampel udang sebagai sumber inokulum, 3: kontrol negatif PCR, 4: kontrol positif WSSV

Berdasarkan, hasil uji penentuan pengenceran larutan stok WSSV menunjukkan bahwa letal dosis 50% ( $LD_{50}$ ) diperoleh pada pengenceran larutan stok WSSV  $10^{-5}$ , yang diindikasikan terlihatnya pita pada visualisasi gel *agarose* pada pasangan basa 982, sedangkan pada pengenceran lebih rendah yaitu  $10^{-6}$  dan  $10^{-7}$  menunjukkan hasil negatif WSSV pada visualisasi gel elektroforesis, yang ditunjukkan dengan tidak terlihatnya pita pada visualisasi gel elektroforesis (Gambar II.11).



**Gambar II.11.** Hasil elektroforesis produk PCR sampel udang hari ke 14 berdasarkan pengenceran berseri stok WSSV  
 1: marker DNA, 2: pengenceran  $10^{-3}$ , 3: pengenceran  $10^{-4}$ , 4: pengenceran  $10^{-5}$ , 5: pengenceran  $10^{-6}$ , 6: pengenceran  $10^{-7}$ , 7: kontrol negatif PCR, 8: kontrol positif WSSV.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa gejala klinis serangan WSSV mulai terlihat pada hari ketiga pada pengenceran larutan stok WSSV  $10^{-3}$ . Udang mulai mengalami penurunan nafsu makan, warna tubuh pucat, lemah, berenang tidak terarah dan usus kosong, namun belum menimbulkan kematian. Gejala yang sama terjadi setelah hari ke empat untuk pengenceran  $10^{-4}$  dan hari ke enam untuk  $10^{-5}$ . Kematian 50% dijumpai hari ke 14 pada pengenceran  $10^{-5}$ , sedangkan pengenceran  $10^{-3}$  dan  $10^{-4}$  mencapai 100% dan 80% secara berturut-turut pada periode yang sama. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Lightner (1996) dan Witteveldt (2006) yang menyatakan bahwa serangan virus WSSV sangat ganas dan dapat

menimbulkan kematian masal hingga mencapai 100% setelah 3 -10 hari udang terinfeksi. Hasil deteksi dengan metode PCR, terlihat bahwa negatif WSSV terlihat pada pengenceran  $10^6$  dan  $10^7$ . Hal ini diduga karena konsentrasi larutan stok WSSV yang terlalu rendah, sebagai akibat pengenceran  $(1-10) \cdot 10^6$  kali. Virus WSSV kemungkinan tidak dapat melakukan penetrasi ke dalam jaringan sel pada udang (Lewis & Leong 2004).

Hamsah (2004) melaporkan bahwa pengenceran larutan stok WSSV  $10^{-5}$  serta perendaman selama 3 jam dapat menginfeksi udang windu. Model penelitian yang sama dilakukan oleh Chang dkk. (1999) yang melakukan penentuan  $LD_{50}$  terhadap *post larva* dan juvenil udang windu (*P. monodon*).  $LD_{50}$  tercapai setelah 48 jam melalui pengenceran 500x dengan perendaman selama 2 jam dan pengenceran 20x melalui penyuntikan untuk udang ukuran juvenil. Perbedaan tersebut diduga karena perbedaan sumber inokulum yang dibuat. Sumber infeksi inokulum yang digunakan oleh Chang dkk. (1999) diduga memiliki tingkat infeksi WSSV lebih berat (*severe infected*) (Lo dkk. 1996) atau juga karena faktor stres saat penelitian berlangsung (Peng dkk. 1998). Infeksi WSSV dapat meningkat eskalasinya saat udang dalam kondisi stres. Lo dkk. (1996) melakukan penelitian untuk membuktikan hubungan stres dengan tingkat infeksi. Penelitian yang dilakukan menunjukkan bahwa deteksi WSSV positif yang dilakukan dengan metode 2 langkah (*2-step WSSV PCR-positive*) dapat menjadi metode 1 langkah (*1-step WSSV PCR-positive*) setelah dilakukan pemotongan/pencabutan

(*excision*) kaki jalan sebagai pemicu stres (Peng dkk.1998). Penelitian tersebut mengindikasikan bahwa terdapat hubungan antara stres yang terjadi pada udang dengan tingkat infeksi.

### **Evaluasi kelangsungan hidup udang**

Hasil penelitian menunjukkan variasi kelangsungan hidup udang vannamei (Lampiran II.1). Terdapat 19 dari 71 isolat bakteri lokal (Gambar II.12) yang memiliki potensi sebagai kandidat probiotik. Hal tersebut diindikasikan dengan adanya perbedaan nyata lebih tinggi ( $p < 0,05$ ) dibandingkan dengan kontrol terhadap parameter kelangsungan hidup (Lampiran II.2a). Distribusi 19 isolat bakteri berdasarkan sumber substrat cukup merata yaitu dari usus udang 8 isolat (42,1%), dari air 7 isolat (36,8%) dan dari sedimen 4 isolat (21,1%). Jika dilihat dari daerah sampling, terlihat bahwa daerah yang paling banyak menunjukkan kelangsungan hidup lebih tinggi dibandingkan kontrol adalah Tangerang yaitu 8 isolat (42,1%), kemudian Pandeglang 6 isolat (31,6%), Serang 3 isolat (15,8%) dan Karawang 2 isolat (10,5%).

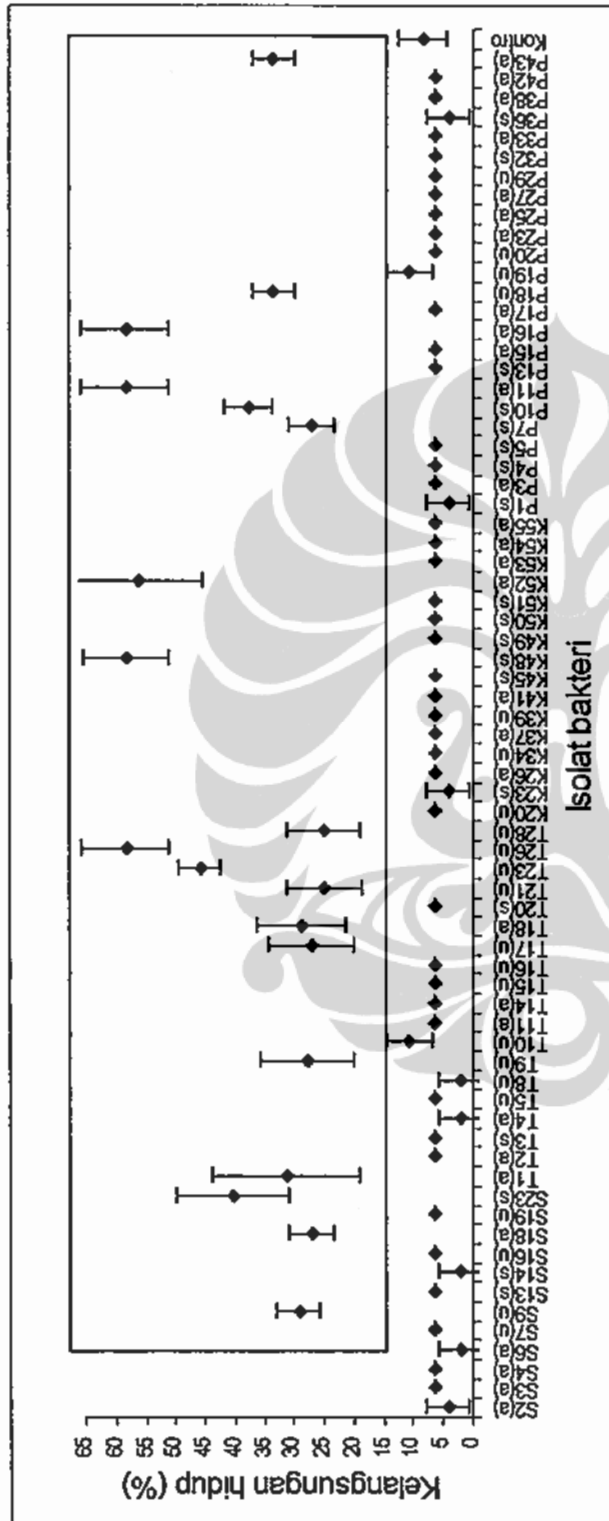
Sembilan belas isolat bakteri tersebut diwakili oleh perlakuan T<sub>26(u)</sub>, K<sub>48(s)</sub>, P<sub>11(a)</sub>, P<sub>16(a)</sub>, K<sub>52(a)</sub>, T<sub>23(u)</sub>, S<sub>23(s)</sub>, P<sub>10(s)</sub>, P<sub>18(u)</sub>, P<sub>43(a)</sub>, T<sub>1(a)</sub>, S<sub>9(u)</sub>, T<sub>18(a)</sub>, T<sub>9(u)</sub>, S<sub>18(a)</sub>, T<sub>17(u)</sub>, P<sub>7(s)</sub>, T<sub>21(u)</sub>, dan T<sub>28(u)</sub>. Penyebutan kode isolat berurutan dari nilai kelangsungan hidup udang tertinggi (58,3%) hingga terendah (24,9%), sedangkan perlakuan kontrol, yaitu tanpa pemberian kandidat probiotik hanya mencapai 8,3%. Tingkat kelangsungan hidup udang tertinggi

diberikan oleh 5 isolat (T<sub>26</sub>, K<sub>48</sub>, P<sub>11</sub>, dan P<sub>16</sub> mencapai 58,3% dan K<sub>52</sub> mencapai 56,2%). Isolat-isolat tersebut berasal dari 3 daerah sampling yaitu Tangerang, Karawang dan Pandeglang, dengan 3 sumber substrat yaitu: usus udang (u), sedimen (s) dan air (a).

Sembilan belas isolat yang menunjukkan kelangsungan hidup udang lebih tinggi yaitu 24,9% - 58,3% dibandingkan dengan kontrol (tanpa penambahan kandidat probiotik) yang hanya 8,3%, dimungkinkan berkaitan erat dengan tingkat kesehatan udang tersebut. Isolat-isolat bakteri tersebut diduga mampu meningkatkan respon imunitas udang (Rengpipat dkk. 2000; Balcázar dkk. 2006) terutama respon selular berupa aktifitas fagositosis dari hemosit yang merupakan bentuk pertahanan diri, sehingga patogen yang ada tidak dapat berkembang.

Sembilan belas isolat bakteri diduga menjadi pemicu aktifnya sistem pertahanan dalam tubuh udang, yaitu memicu sel darah udang melepaskan beberapa protein sebagai proenzim dan substrat yang akan terlibat dalam proses penggumpalan (*clotting*), pengaktifan sistem *prophenoloxidase* (*proPO*), dan proses selular lainnya (Gambar II.8) (Van de Braak 2002).

Jika dilihat dari daerah sampling, terlihat bahwa 4 daerah yaitu Serang, Tangerang, Karawang dan Pandeglang, memberikan kontribusi isolat bakteri yang menunjukkan tingkat kelangsungan hidup udang lebih baik dibandingkan dengan kontrol, meskipun dengan variasi jumlah berbeda, yaitu Serang 3 isolat, Tangerang 8 isolat, Karawang 2 isolat dan Pandeglang 6 isolat. Tingkat kelangsungan hidup udang yang baik karena empat daerah



**Gambar II.12.** Persentase kelangsungan hidup udang vannamei dari isolat bakteri lokal potensial hasil seleksi setelah diuji terhadap WSSV. Isolat-isolat yang memiliki nilai lebih tinggi dari kontrol ditunjukkan di dalam kotak.



tersebut merupakan daerah pertambakan udang *penaeid* (Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya 2004), sehingga populasi bakterinya cukup bervariasi. Gatesoupe (1999) yang menyatakan bahwa tambak yang sudah lama digunakan memiliki variasi bakteri yang lebih dibandingkan dengan tambak yang baru, sehingga peluang terdapatnya bakteri yang bersinergi positif terhadap udang cukup besar.

Berdasarkan substrat untuk isolasi bakteri yang diambil, terlihat bahwa ketiga sumber bahan yaitu air (a), sedimen (s) dan usus udang (u) ternyata dapat memberikan kontribusi isolat bakteri yang potensial untuk meningkatkan kelangsungan hidup udang vannamei. Kondisi tersebut sejalan dengan Verschuere dkk. (2000), Rengpipat dkk. (2000), dan Balcázar dkk. (2006) yang mengatakan bahwa sumber substrat yang sering diambil isolatnya untuk pengembangan bakteri probiotik adalah air atau media pemeliharaan, sedimen, dan saluran pencernaan (*digestive tract*). Pada ketiga jenis substrat tersebut terdapat zat-zat organik maupun non organik yang dibutuhkan oleh bakteri untuk hidup dan berkembangbiak (Oginsky dan Umbreit 1958).

### **Evaluasi indeks imunitas udang**

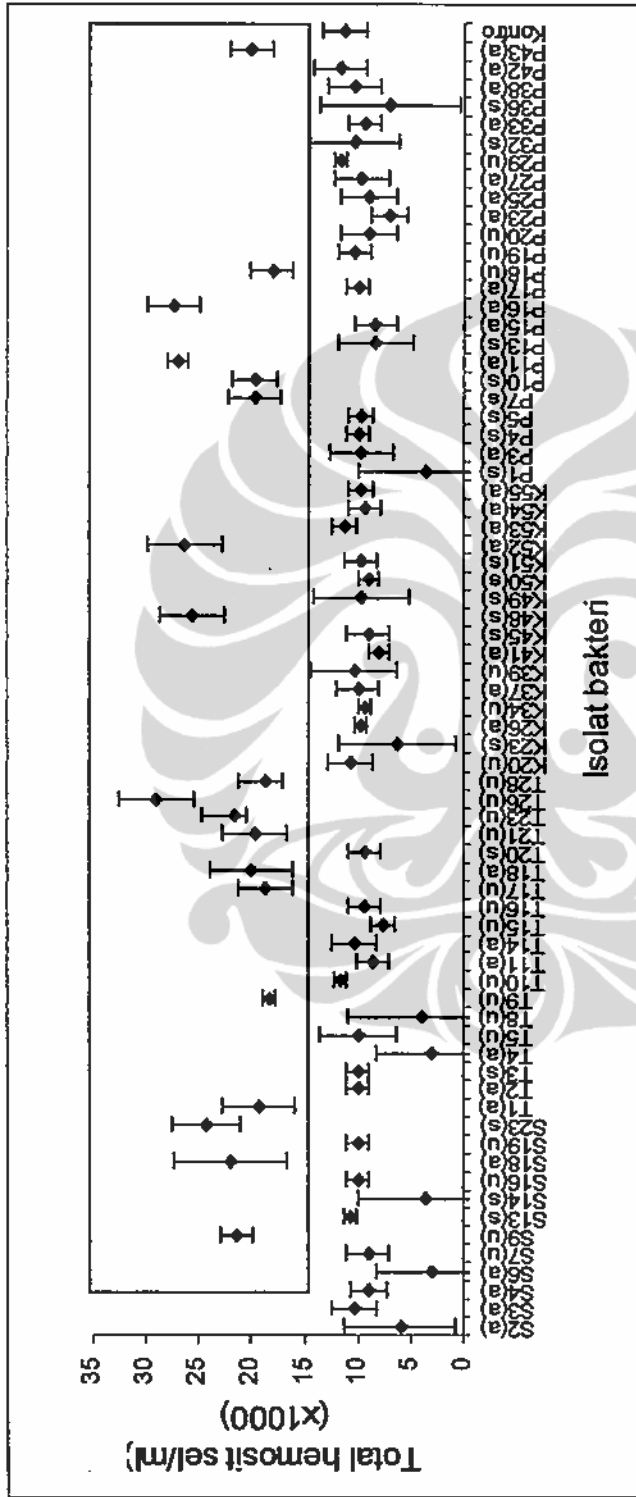
Hasil pengamatan mengindikasikan bahwa indeks imunitas (Lampiran II.3 dan II.4) berkaitan erat dengan parameter kelangsungan hidup udang. Isolat yang menunjukkan nilai kelangsungan hidup udang yang tinggi juga menunjukkan indeks imunitas yang tinggi. Sembilan belas isolat tersebut,

memperlihatkan aktivitas fagositosis dan jumlah total hemosit udang (Gambar II.13 dan II.14) berbeda nyata lebih tinggi ( $p < 0,05$ ) (Lampiran II.2b-c) dibandingkan dengan kontrol (tanpa penambahan kandidat bakteri probiotik).

Nilai aktivitas fagositosis udang untuk 19 isolat bakteri lokal terpilih mencapai 17,7%-30% dibandingkan dengan kontrol yang hanya mencapai 11%. Sementara nilai total hemosit udang mencapai 18.000 – 29.000 sel/mm<sup>3</sup> dibandingkan dengan kontrol 11.300 sel/mm<sup>3</sup>. Pada perlakuan kontrol, meskipun masih ada udang yang hidup, namun kondisi udangnya tidak terlihat prima. Udang terlihat lemah, warna tidak cerah dan kurang aktif bergerak, sehingga nilai indeks imunitasnya rendah. Pada pengamatan terpisah terhadap udang vannamei sehat tanpa penambahan probiotik diperoleh jumlah total hemosit mencapai 18.500 – 35.000 sel/mm<sup>3</sup>. Nilai total hemosit tersebut relatif tidak berbeda dengan total hemosit udang yang ditambahkan kandidat probiotik yaitu 18.000 – 29.000 sel/mm<sup>3</sup>.

Sembilan belas isolat bakteri lokal terbaik diduga memiliki salah satu mekanisme, yaitu meningkatkan respon imunitas udang vannamei Verschuere dkk. (2000) dan Balcázar dkk. (2006). Bakteri kandidat probiotik diduga menjadi imunostimulan yang mengaktifkan respon imunitas pada udang dengan aktifitas fagositosis melalui sel *hyalin* dan *semigranular*, sehingga udang lebih resisten terhadap infeksi patogen (Burgent dkk. 2004; Alavandi dkk. 2004). Hal tersebut sejalan dengan pernyataan Soderhall & Cerenius (1998) lihat Verschuere (2000) menyatakan bahwa udang dan invertebrata lainnya memiliki sistem imun yang kurang berkembang





**Gambar II.14.** Total hemosit udang vannamei dari isolat bakteri lokal potensial hasil seleksi setelah diuji terhadap WSSV selama 21 hari. Isolat-isolat yang memiliki nilai lebih tinggi dari kontrol ditunjukkan di dalam kotak.

dibandingkan dengan ikan dewasa dan lebih banyak menggantungkan pada respon imun non spesifik untuk mempertahankan dari serangan infeksi. Van de Braak (2002) menyatakan bahwa sel *hyalin* akan berkembang menjadi sel semigranular, kemudian bergerak menuju *connective tissue* hingga menjadi sel granular. Jika terjadi gangguan berupa stres, atau serangan penyakit, sel granular tersebut dapat kembali ke *hemolymph* untuk mengantisipasi gangguan yang terjadi (Gambar II.6).

Pada sistem pertahanan selular pada udang, aktivitas fagosit dari hemosit mempunyai fungsi sangat penting. Sel-sel fagosit ini berfungsi untuk melakukan fagositosis terhadap benda asing yang masuk ke dalam tubuh inang (Supamattaya dkk. 1998). Sel *hyalin* dan *semi granular* dari hemosit meningkatkan aktivitas fagositosis pada udang tersebut (Supamattaya dkk. 1998; Johansson dkk. 2000).

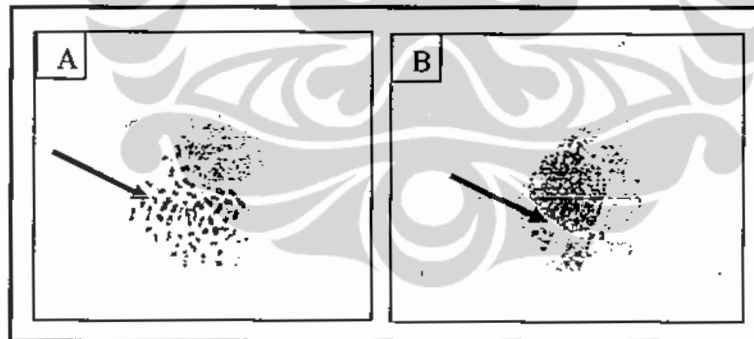
Sembilan belas isolat bakteri kandidat probiotik tersebut, diduga memiliki periode waktu interaksi lebih lama dalam tubuh udang dan media pemeliharannya dibandingkan dengan imunostimulan seperti *glukan* dan lipopolisakarida (LPS) (Sung dkk. 1994). Aktivitas metabolisme bakteri yang sengaja ditambahkan dalam media pemeliharaan udang selama 21 hari penelitian, diduga hidup dan aktif sehingga memicu fungsi pertahanan tubuh udang lebih baik, sehingga *hyalin* dan semigranulosit mampu memfagosit partikel asing lebih agresif (Itami dkk. 1998; Rengpipat dkk. 2000; Supamattaya dkk. 2000). Hal tersebut terbukti berdasarkan hasil penghitungan total bakteri pada akhir penelitian berkisar  $10^7$ - $10^8$ /ml yang

didukung dengan lebih tingginya nilai indeks imunitas udang dibandingkan dengan kontrol untuk 19 isolat bakteri lokal terpilih, yaitu 17,7%-30% berbanding 11% untuk aktivitas fagosit udang, 18.000-29.000 sel per mm<sup>3</sup> berbanding 11.300 sel per mm<sup>3</sup> untuk total hemosit udang. Rengpipat dkk. (2000) melaporkan bahwa udang windu yang sehat memiliki jumlah total hemosit antara 10<sup>3</sup>-10<sup>5</sup> sel/mm<sup>3</sup>, sedangkan udang yang sakit akan turun drastis hingga mencapai 1-2 log unit tergantung dari variasi individu yang dipengaruhi oleh faktor genotip maupun fenotip.

Rengpipat dkk. (1998) dan Rengpipat dkk. (2000) telah melakukan studi terhadap imunitas udang *penaeid* menggunakan bakteri probiotik *Bacillus* S11. Bakteri *Bacillus* S11 mampu meningkatkan indeks fagositasi (IP) udang windu (*P. monodon*) 4,5 kali lebih tinggi, dibandingkan dengan kontrol, yaitu 2,7±0,8 berbanding 0,6±0,3 terhadap bakteri patogen *Vibrio harveyi*. Hal tersebut diduga karena adanya peningkatan sistem imunitas dari udang tersebut melalui aktivitas sel *hyalin* dan sel *semi granular* (Alday-sanz 1995).

Balcázar dkk. (2003) memperkuat pernyataan Rengpipat dkk. (2000), bahwa pemberian bakteri *Bacillus* dan *Vibrio* sp. mampu meningkatkan pertumbuhan dan kelangsungan hidup udang windu yang dipapar terhadap patogen *Vibrio harveyi* dan WSSV. Hasil dua penelitian tersebut semakin kuat mendukung bahwa 19 isolat bakteri yang menunjukkan hasil lebih baik terhadap beberapa parameter uji memiliki kemampuan meningkatkan imunitas udang.

Alday-sanz (1995) menyatakan lebih lanjut bahwa udang mempunyai sistem kekebalan lebih sederhana dibandingkan dengan vertebrata. Udang tidak mempunyai *immunoglobulin* dan *T-lymphosit* yang dapat mendeteksi respon. Dengan demikian, fagositosis memegang peranan utama dan dapat menjadi mekanisme pertahanan utama dalam sistem pertahanan selular. Fagositosis merupakan media penangkapan partikel asing atau partikel lainnya oleh sel tubuh. Partikel asing akan ditangkap oleh sirkulasi hemosit dan dihambat dalam nodul hemosit atau enkapsulasi dengan membentuk beberapa lapisan sel. Reaksi ini dilakukan oleh *haemolymph* yang disebut hemosit, yaitu sel *hyalin*, (Gambar II.15; merupakan contoh visualisasi dari sel *hyalin* yang banyak/aktif memfagosit (A) dan sedikit memfagosit (B); ditunjukkan dengan tanda panah) dan sel *semi granular*.



**Gambar II.15.** Contoh visualisasi aktivitas fagosit udang oleh sel *hyalin* dari sampel T<sub>26</sub>. A: sel *hyalin* banyak memfagosit (tanda panah menunjukkan sel *hyalin* memfagosit bakteri *Staphylococcus aureus*. B: sel *hyalin* sedikit memfagosit bakteri *Staphylococcus aureus*.

Belanti (1993) menambahkan bahwa fagositosis merupakan bagian dari respon imun non spesifik, dan berperan pada pertemuan pertama hospes dengan benda-benda asing. Benda asing berupa virus yang masuk ke dalam tubuh udang, dicerna (difagosit) oleh sel *hyalin* dan sel semigranular (Gambar II.7).

Alasan lain yang mendukung keberhasilan 19 isolat bakteri lokal tersebut adalah diduga 19 isolat bakteri mampu berkompetisi dan mendominasi populasi bakteri di dalam organ pencernaan udang (*shrimp's gut*) (Verschuere dkk. 2000). Meskipun tidak dilakukan pengujian selama penelitian, namun beberapa laporan seperti yang dikemukakan Geovany dkk. (2007) yang melaporkan bahwa bakteri *Micrococcus* sp. yang diisolasi dari usus ikan Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) yang dicampur pada pakan buatan berupa pelet mampu meningkatkan resistensi terhadap serangan infeksi dapat dijadikan rujukan bahwa diduga 19 isolat mampu berkompetisi dan mendominasi dalam saluran pencernaan udang. Bakteri probiotik yang diberikan lewat pakan, masuk ke dalam organ pencernaan ikan dan mampu mendominasi populasi bakteri yang ada di dalam organ pencernaan tersebut, karena jumlahnya jauh lebih banyak, yaitu sekitar  $10^6$ /ml.

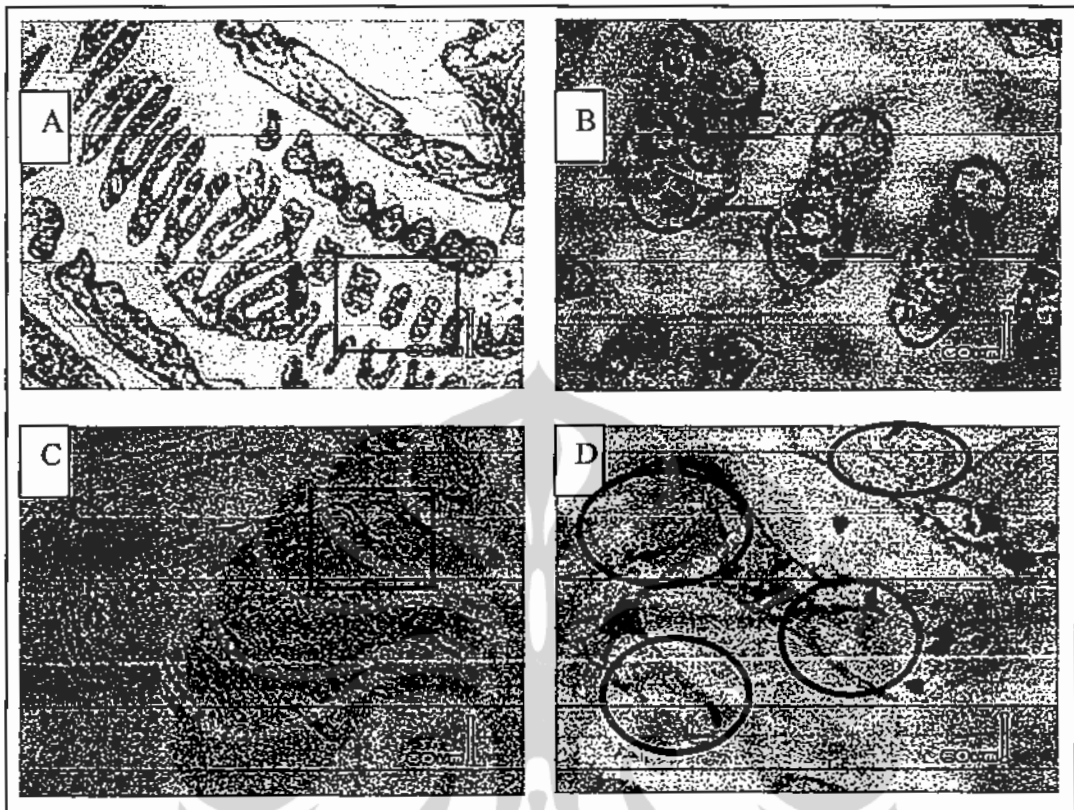
Verschuere dkk. (2000), melaporkan bahwa penambahan bakteri probiotik kode BY9 dengan konsentrasi  $10^6$ /ml, ternyata mampu meningkatkan kelangsungan hidup udang windu, *P. monodon* sebesar 46,1% dan menurunkan densitas *Vibrio harveyi* sebesar 10,6% meskipun hanya ditambahkan ke dalam air pemeliharaan. Konsentrasi  $10^6$ /ml diduga



mampu mendominasi/menghambat populasi bakteri dalam inang maupun lingkungannya sehingga meningkatkan kesehatan udang.

### **Evaluasi histopatologi udang dan deteksi WSSV dengan metode PCR**

Histopatologi organ insang udang yang diambil secara acak (Gambar II.16) dari perlakuan yang ditambahkan kandidat probiotik (A,B) menunjukkan visualisasi yang lebih baik dibandingkan dengan perlakuan *kontrol* (C,D). Visualisasi histopatologi pada perlakuan kontrol memperlihatkan gejala degenerasi, yaitu menurunnya fungsi sel. Secara makroskopis jaringan insang dengan penambahan bakteri probiotik (A) lebih besar dibandingkan dengan yang tanpa penambahan bakteri (C). Pada gambar yang lebih detail, terlihat inti sel (tanda panah) lebih banyak pada jaringan dengan penambahan probiotik (B) dibandingkan dengan tanpa penambahan bakteri (tanda lingkaran) (D).

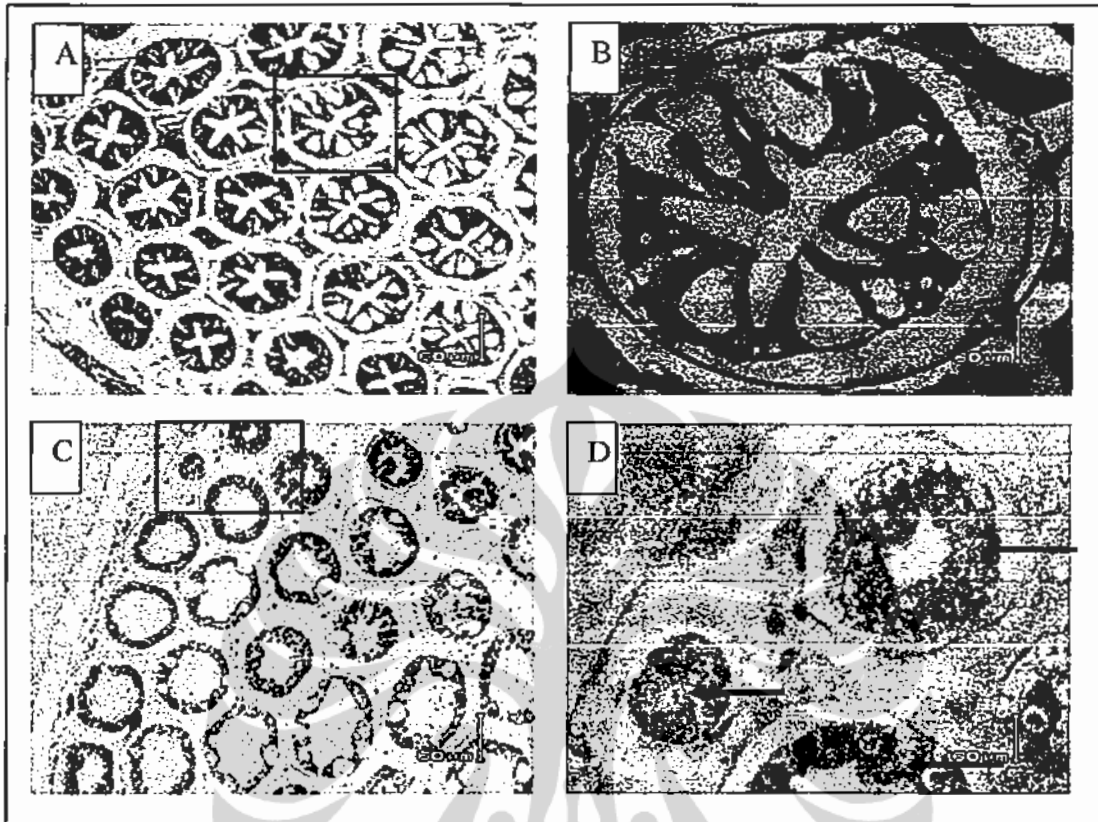


**Gambar II.16.** Histopatologi insang udang vannamei dengan pewarnaan H&E (potongan longitudinal). A: sampel udang yang diinfeksi WSSV dan ditambahkan kandidat bakteri probiotik lokal isolat T<sub>26</sub>, perbesaran 100x. B: detail dari sebagian jaringan dengan perbesaran 400x. C: kontrol, udang yang diinfeksi WSSV tanpa penambahan kandidat bakteri probiotik lokal, perbesaran 100x. D: detail dari sebagian jaringan dengan perbesaran 400x. Secara makroskopis jaringan insang dengan penambahan bakteri probiotik (A) lebih besar dibandingkan dengan yang tanpa penambahan bakteri (C). Pada gambar detail, terlihat inti sel (tanda panah) lebih banyak pada jaringan dengan penambahan probiotik (B) dibandingkan dengan tanpa penambahan bakteri (tanda lingkaran) (D). Tanda garis kotak menunjukkan bagian jaringan yang di amati lebih detail.

Sementara pada hepatopankreas (Gambar II.16), perlakuan dengan penambahan kandidat probiotik terpilih (A,B) juga menunjukkan visualisasi

yang lebih baik dibandingkan dengan perlakuan kontrol (C,D). Visualisasi histopatologi pada perlakuan kontrol memperlihatkan kerusakan sel (degenerasi). Pada Gambar II.17 (C,D), jaringan pada hepatopankreas terlihat mengecil dibandingkan dengan (A,B).

Visualisasi histopatologi pada perlakuan kontrol memperlihatkan gejala degenerasi, yaitu menurunnya fungsi sel. Secara makroskopis jaringan hepatopankreas dengan penambahan bakteri probiotik (A) terlihat lebih normal dan ukurannya lebih besar dibandingkan dengan yang tanpa penambahan bakteri (C). Pada gambar yang lebih detail, terlihat bentuk yang ukuran yang lebih normal dan besar pada jaringan dengan penambahan probiotik (tanda panah) (B) dibandingkan dengan tanpa penambahan bakteri (tanda lingkaran) (D).



**Gambar II.17.** Histopatologi hepatopankreas udang vannamei dengan pewarnaan H&E (potongan melintang). A: sampel udang dari isolat T<sub>26</sub> dengan penambahan bakteri probiotik lokal, perbesaran 100x, B: detail dari sebagian jaringan dengan perbesaran 400x. C: kontrol tanpa bakteri probiotik lokal, perbesaran 100x, D: detail dari sebagian jaringan dengan perbesaran 400x. Secara makroskopis jaringan hepatopankreas dengan penambahan bakteri probiotik (A) terlihat lebih normal dibandingkan dengan yang tanpa penambahan bakteri (C). Pada gambar detail, terlihat bentuk dan ukuran terlihat sempurna pada jaringan dengan penambahan probiotik (tanda lingkaran) (B) dibandingkan dengan tanpa penambahan bakteri (tanda panah) (D). Tanda garis kotak menunjukkan bagian jaringan yang di amati lebih detail.

Kondisi tersebut sesuai dengan pendapat Lightner (1996) yang menyatakan bahwa serangan WSSV dapat mengakibatkan kerusakan

jaringan sel pada udang termasuk organ insang dan hepatopankreas. Kerusakan tersebut dapat berupa *atrophy* yaitu menurunnya jumlah *cytoplasma* dari sel, *degenerasi* (menurunnya fungsi sel) hingga *nekrosis* (kematian sel).

Chou dkk. (1995) melaporkan bahwa pada udang *Penaeus japonicus* yang diinfeksi dengan WSSV menunjukkan adanya degenerasi pada hepatopankreas. Perubahan secara histopatologi tersebut terjadi setelah udang dipapar pada inokulum WSSV selama 1 jam, dan pengamatan histopatologi dilakukan pada udang yang sekarat (*moribund*).

Lightner (1996) menyatakan bahwa reaksi yang mungkin terjadi dari suatu organisme untuk mempertahankan kesetimbangan (*homeostasis*) dalam tubuhnya melalui beberapa cara di antaranya: adaptasi selular (*cellular adaptation*), degenerasi sel (*cell degeneration*), kematian sel (*cell death*), reaksi peradangan (*inflammatory reactions*), Kelainan dalam pertumbuhan (*growth defect*), dan gangguan sistem peredaran cairan dalam tubuh (*odema*). Reaksi yang terjadi tergantung pada besarnya dari serangan patogen yang ada.

Organ hepatopankreas udang vannamei juga mengalami degenarasi dan kematian sel (*necrosis*). Hal tersebut berbeda dengan pernyataan Zuidema dkk. (2004), yang menyatakan bahwa jaringan/organ hepatopankreas dan usus (*mid gut*) tidak dipengaruhi oleh serangan WSSV. Organ dalam (*mesodermal*) yang dapat diterindikasi serangan virus hanya

organ limfoid, *antennal gland* dan *connective tissue*. Hal tersebut diduga karena infeksi dari WSSV tidak terlalu berat (*light infected*).

Temuan terhadap organ hepatopankreas tersebut, sejalan dengan hasil penelitian Hamsah (2004), yang menyatakan bahwa benur udang windu yang diberi pakan hidup berupa *Artemia* dan *Rotifera* yang terinfeksi WSSV, menunjukkan indikasi *hyperthropy* (meningkatnya total massa sel) pada jaringan hepatopankreas udang windu. Kondisi tersebut menunjukkan bahwa infeksi WSSV sangat mempengaruhi organ udang baik *ektodermal* maupun *endodermal*.

Visualisasi histopatologi kedua organ insang dan hepatopankreas, tidak terlihat adanya badan inklusi, di mana inti sel mengalami pembengkakan (*hipertropy*). Badan inklusi merupakan ciri spesifik adanya infeksi WSSV pada sel organ target dari virus tersebut (Lightner 1996). Hamsah (2004) menyatakan bahwa sel yang terinfeksi WSSV, inti selnya terus membesar karena virus telah memerintahkan sel tersebut untuk memperbanyak dirinya secara cepat. Pembengkakan inti sel juga diikuti oleh membesarnya ukuran sel. Badan inklusi yang tidak terlihat, diduga karena kurang maksimalnya visualisasi histopatologi kedua organ tersebut terutama saat pengamatan preparat histopatologi di mikroskop. Mikroskop yang digunakan tidak dilengkapi dengan perangkat pendukung *dark field filter* dan *phase kontras* yang berfungsi untuk membuat tampilan lebih jelas dan terang.

Kemungkinan lainnya adalah sel telah mengalami kerusakan yang cukup parah, yaitu diduga sudah mencapai *grade 4*. Lightner (1996)

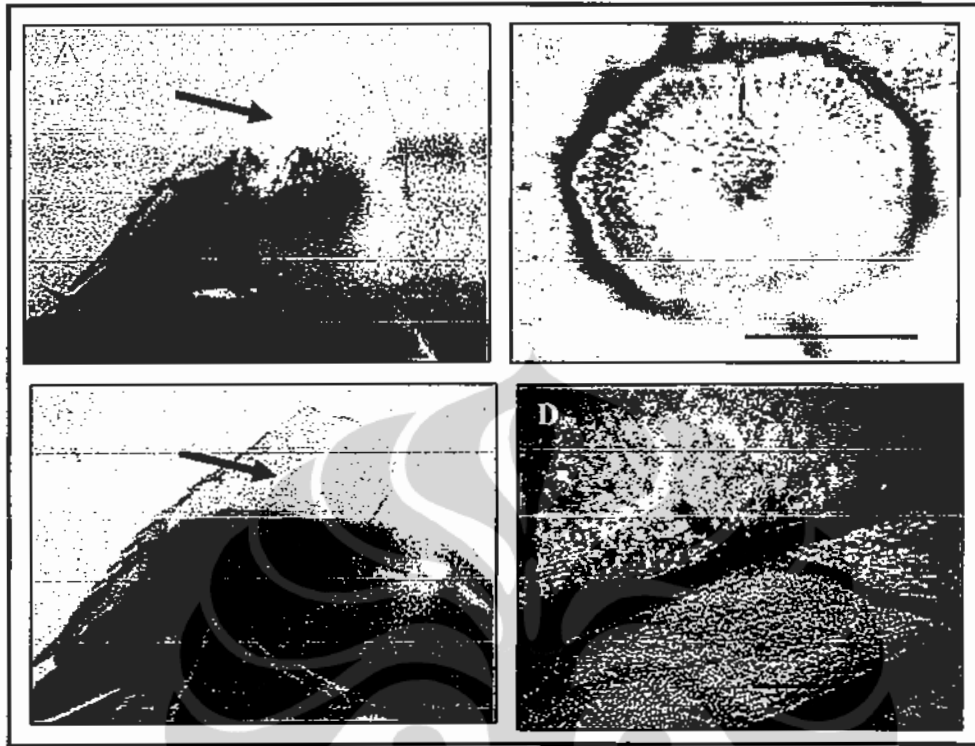
menyatakan bahwa terdapat 4 *grade* tingkat kerusakan sel akibat WSSV, yaitu *grade* 0 hingga *grade* 4. Pada *grade* 4 (level tertinggi), sel telah pecah dengan inti sel keluar dari sel. Dugaan tersebut didasarkan karena pengamatan histopatologi dilakukan pada akhir penelitian, yaitu hari ke-21 sehingga tingkat kerusakan sel diperkirakan sudah mencapai *grade* tinggi. Kondisi tersebut merujuk kepada Hamsah (2004) yang melaporkan bahwa pengamatan pada organ insang, hepatopankreas, limfoid, usus dan kulit udang windu menunjukkan adanya peningkatan tingkat kerusakan sel sejalan dengan bertambahnya waktu pengamatan. Tingkat kerusakan sel *grade* 3 (inti sel sangat besar dalam ambang menjadi pecah) dan *grade* 4 (sel telah pecah dan inti sel telah keluar) sudah mulai terlihat pada hari ke 7 hingga hari ke 21. Hamsah (2004) menyatakan lebih lanjut bahwa dari hasil pengamatan, terlihat organ insang memiliki tingkat kerusakan sel tertinggi dan waktu kerusakan lebih cepat dibandingkan dengan organ lainnya. Pada hari ke-7 dan ke-9 kerusakan sel sudah mencapai *grade* 3 dan *grade* 4 dengan prevalensi 100%.

Visualisasi histopatologi yang lebih baik dari 19 isolat kandidat terpilih dibandingkan dengan kontrol pada organ insang dan hepatopankreas udang, diduga merupakan efek atau kontribusi dari meningkatnya respon imunitas melalui aktivitas fagositosis udang akibat peran dari kandidat probiotik tersebut. Virus sebagai patogen diduga tidak dapat mengembangkan proses lebih jauh dalam tubuh udang (Lewis & Leong 2004; Ka Yin 2004). Fagositosis, melalui sel *hyalin* dan semi granular merupakan media penangkapan partikel asing

atau partikel lainnya oleh sel tubuh. Partikel asing ditangkap oleh sirkulasi hemosit dan dihambat dalam nodul hemosit atau enkapsulasi dengan membentuk beberapa lapisan sel (Alday-sanz 1995).

Sementara pada karapas udang kontrol (tanpa penambahan bakteri probiotik), ditemukan bintik putih (Gambar II.18). Bintik putih yang ditemukan memiliki bentuk dan ukuran yang bervariasi, yaitu bentuk cenderung bulat dengan diameter 0,5-2,0 mm (Lightner, 1996). Lightner(1996) menyatakan lebih lanjut, bahwa bintik putih pada karapas disebabkan oleh deposit garam kalsium yang abnormal pada epidermis kutikula. Udang membutuhkan kalsium untuk pembentukan karapas dalam masa pertumbuhan. Infeksi virus WSS dalam lapisan kulit udang mengakibatkan rusaknya keseimbangan produksi kalsium pada udang, sehingga dapat menyebabkan pengeluaran kalsium secara berlebihan.



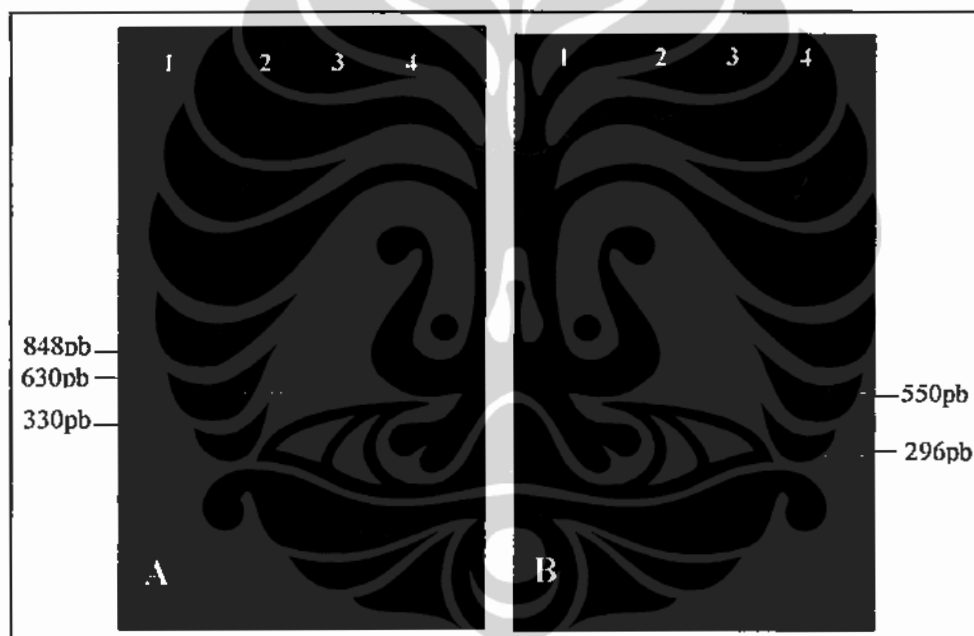


**Gambar II.18.** Visualisasi bercak putih pada udang yang terinfeksi WSSV, A: Kontrol (tanpa bakteri), terlihat bintik putih pada karapas, B: pengamatan mikroskopis salah satu bintik putih WSSV pada karapas, perbesaran 400x . C: udang yang tidak terinfeksi WSSV (sampel isolat T<sub>26</sub>) tidak terlihat bintik putih pada karapas, D: pengamatan mikroskopis karapas udang dari sampel T<sub>26</sub>, perbesaran 400x Garis skala : 0,5 mm

Variasi bentuk dan ukuran bintik putih yang ditemukan, menunjukkan adanya perubahan dari bintik putih tersebut. Pada penelitian ini, fase perkembangan bintik putih yang ditemukan tidak dapat ditentukan. Hamsah (2004) mengatakan bahwa belum adanya standardisasi metode dan alat yang digunakan untuk pengukuran *spot* menyebabkan terjadinya variasi hasil

yang didapat, sehingga sulit untuk menentukan ukuran terkecil yang pertama muncul dari *spot* tersebut.

Visualisasi histopatologi udang juga berkaitan erat terhadap deteksi infeksi virus menggunakan metode PCR. Sampel udang yang yg ditambahkan salah satu (isolat T<sub>26</sub>) dari 19 isolat terpilih menunjukkan hasil negatif (Gambar II.19 B), sementara kontrol (Gambar II.19 A) menunjukkan hasil positif pada visualisasi gel elektroforesis.



**Gambar II.19.** Hasil elektroforesis produk PCR sampel udang vannamei yang diinfeksi WSSV. A: tanpa penambahan kandidat bakteri probiotik; B: penambahan dengan kandidat probiotik isolat T<sub>26</sub>. 1: *marker* DNA; 2: sampel udang yang diinfeksi; 3: kontrol negatif PCR; 4: kontrol positif WSSV udang vannamei yang diinfeksi WSSV. Garis kotak merupakan indikator pita DNA negatif dari sampel menggunakan kandidat probiotik, yaitu 848 pb dan kontrol positif WSSV, yaitu 550 pb dan 296 pb.

Sembilan belas isolat kandidat probiotik mampu menekan perkembangan dari patogen WSSV melalui aktivitas fagositosis udang, sehingga patogen tertahan untuk dapat masuk/penetrasi ke dalam tubuh udang. Lewis & Leong (2004) dan Ka Yin (2004) menyatakan bahwa tahapan multiplikasi dari DNA virus diawali dengan pelekatan partikel virus (*attachment*) pada permukaan sel yang peka, sebelum melanjutkan ke tahapan penetrasi, pelepasan selubung virus (*uncoating*), perekaman (*transcription*) hingga tahap akhir perakitan (*assembly*) virus baru dan pelepasan virus yang matang (*released by budding*).

Faktor lain yang diduga berkontribusi menghilangkan WSSV pada udang vannamei setelah diterapi dengan isolat bakteri probiotik yang ditunjukkan dengan deteksi negatif WSSV pada udang melalui pengujian dengan metode PCR dibandingkan dengan kontrol adalah faktor kompetisi. Sembilan belas isolat bakteri probiotik kemungkinan mampu berkompetisi ruang dengan WSSV pada udang vannamei.

Penjelasan di atas mengindikasikan bahwa, bakteri probiotik dimungkinkan untuk digunakan sebagai agen terapi (*therapeutic agent*) untuk menanggulangi serangan WSSV pada udang vannamei.

#### **Evaluasi total jumlah bakteri dan kualitas air media pemeliharaan udang**

Jumlah total bakteri kedua perlakuan dan parameter kualitas air tidak menunjukkan perbedaan yang nyata. Total bakteri awal penelitian ( $T_0$ ) sekitar  $10^2$ /ml dan pada akhir penelitian ( $T_{21}$ ) berkisar  $10^7$ - $10^8$ /ml.

Meskipun, tidak dilakukan evaluasi terhadap kemampuan bakteri terhadap produksi komponen penghambat seperti *bacteriocin*, kemampuan terhadap kompetisi untuk zat kimia tertentu atau energi yang tersedia, dan kompetisi mendapatkan tempat untuk hidup, namun diduga setelah kandidat probiotik dimasukkan dalam media penelitian, bakteri tersebut berkembang dan membuat lingkungan menjadi lebih baik dengan menekan mikroorganisme yang tidak menguntungkan dan menjaga populasinya tetap terkontrol dalam media pemeliharaan (Moriarty 1998; Isolauri dkk. 2002). Kondisi tersebut menjadi fungsi profilaksis/pencegah. Hal tersebut dapat dilihat dari jumlah total bakteri pada akhir penelitian ( $D_{21}$ ) tetap stabil berkisar  $10^7$ - $10^8$ /ml.

Beberapa parameter kualitas air pemeliharaan udang yang diamati selama penelitian di antaranya: oksigen terlarut 4,0-5,5 mg/l, pH 7.4-8,1, temperatur 29,0-30,1°C, salinitas 26 ppt, amonium 0,0-0,78 mg/l, nitrit 0,1-0,25 mg/l, dan nitrat 0,5-2,0 mg/l. Kisaran nilai kualitas air tersebut masih dalam batas aman untuk pemeliharaan udang vannamei (Rengpipat dkk. 2000).

## KESIMPULAN

Hasil studi menunjukkan bahwa terdapat 19 isolat bakteri lokal potensial hasil seleksi berdasarkan kemampuan terapi pada udang vannamei yang terinfeksi WSSV. Isolat-isolat bakteri tersebut mampu meningkatkan kelangsungan hidup udang 25-58,3% dibandingkan dengan kontrol (tanpa

penambahan kandidat probiotik) sebesar 8,3%, meningkatkan aktivitas fagositosis udang sebesar 17,7%-30% dibandingkan dengan kontrol sebesar 11%, meningkatkan jumlah total hemosit sebesar 18.000 – 29.000 ribu sel/mm<sup>3</sup> dibandingkan dengan kontrol 11.300 sel/mm<sup>3</sup>, menunjukkan visualisasi histopatologi organ insang dan hepatopankreas lebih baik dibandingkan dengan kontrol, dan menunjukkan deteksi negatif WSSV pada udang dibandingkan dengan kontrol. Isolat-isolat bakteri tersebut dapat dilanjutkan terhadap uji efikasi dengan *Artemia*.

#### DAFTAR ACUAN

- Alavandi, S.V., K.K. Vijayan, T.C.Santiago, M. Purnima, K.P. Jithendran, S.A. Ali & J.J.S. Rajan. 2004. *Evaluation of Pseudomonas sp.* <http://www.fineprint.com>, 6 Oktober, 2006, pk. 21.05 WIB.
- Alavandi, S.V & M. Purnima. 2004. *Bacteriological methods.* <http://www.fineprint.com>, 6 Oktober, 2006, pk. 21.32. WIB.
- Alday-sanz. 1995. *Technical report short course on shrimp disease and health management.* English Ed. Ministry of Higher Education, Republic of Indonesia. SNC-Laavalin International, Inc. In Association with international development program of Australia University and Colleges. PT. Hasfarm Dian Consultant. 125 hlm.
- Balcázar, J.L. 2003. *Evaluation of probiotic bacterial strain in Litopenaeus vannamei.* Final Report. National Center for Marine and Aquaculture Research. Guayaquil, Ecuador. 56 hlm.
- Balcázar, J.L., I.de Blas, I.R.Zarzuela, D. Cunningham, D. Vendrell & J.L. Múszquiz. 2006. The role of probiotic in aquaculture. *Veterinary Microbiology.* 114:173-186.
- Batubara, I.S. 1998. *Pengaruh pemberian vaksin Vibrio harveyi secara perendaman terhadap perubahan tanggap kebal non spesifik pada udang windu (Penaeus monodon Fab.).* Skripsi. FKH IPB. Bogor. 28 hlm.

- Bellanti, J.A. 1993. *Imunology* III. Gadjah Mada University press. 647 hlm.
- Burgents, J.E., K.G. Burnett & L.E. Burnett. 2004. Disease resistance of pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, following the dietary administration of a yeast culture food supplement. *Aquaculture*. 231:1-8.
- Chang, C.F., M.S.Su, H.Y Chen, C.F.Lo, G.H.Kou & I.C.Lio. 1999. Effect of dietary  $\beta$ -1,3-glucan on resistance to white spot syndrome virus (WSSV) in postlarval and juvenile *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Org*. 36:163-168.
- Chou, H.Y, C. Yi Huang, C.H.Wang, H.C Chiang & C.F Lo. 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Dis aquat Org*. 23:165-173.
- Crane, J. 2002. Pro and anti: The biotics of allergic disease. *Thorax*. 57(suppl II):ii40-ii46.
- Cunningham-Rundles, S., S. Ahrne, S. Bengmark, R. Johann-Liang, F. Marshall, L. Metakis, C. Califano, A.M. Dunn, C. Grasse, G. Hinds, & J. Cervia. 2000. Probiotics and immune response. *The American Journal of Gastroenterology*. 1(95):S23-S25.
- Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya. 2004. *Petunjuk Teknis Percontohan Budidaya Udang*. Departemen Kelautan dan Perikanan. 24 hlm.
- Dinkci, N., G. Unal, S. Alkalin & S. Gonc. 2006. The importance of probiotic in pediatrics. *Pakistan Journal of Nutrition*. 5(6):608-611.
- De Vrese, M., & P. R. Marteau. 2007. Probiotics and prebiotics: Effects on diarrhea. *The Journal of Nutrition*. 137:803S-811S.
- FAO FishStat Plus. 2001. *Food and agriculture organization of the United Nations*. Fisheries Department Statistical Database and Software, Version 2.30. <http://www.fao.org>, 7 Desember 2006, pk. 21.05 WIB.
- Feliatra, I. Efendi & E.Suryadi. 2004. Isolasi dan indentifikasi bakteri probiotik dari ikan kerapu macan (*Ephinephelus fuscogutattus*) dalam upaya efisiensi pakan ikan. *Natur Indonesia*. 6(2):75-80.
- Gatesoupe, F.J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. A review. *Aquaculture*. 180:147-165.

- Geovanny, G.R.D., J.L.Balcazar & M.A. Shen. 2007. Probiotic as control agents in aquaculture. A review. *Oceanic and Coastal Sea Research*. 1(6);76-79.
- Griffith, D.R.W. 1995. Microbiology and the role of probiotics in Ecuadorian shrimp hatcheries, *In: Lavens, P., E. Jaspers., I. Roelands. (Eds). Larvi'91-Fish and Crustacean Larviculture Symposium. European Aquaculture Society, Gent. Special Publication. 24:497-501.*
- Gordon, S. 2008. Freeze-dried formula may block HIV virus in breast milk. [Http://www.MedicineNet.com](http://www.MedicineNet.com). 10 September, 2008. pukul 20.00 WIB.
- Gullian, M., F. Thompson & J. Rodriguez. 2004. Selection of Probiotic Bacteria and Study of their Immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. 233:1-14.
- Hameed, A.S.S., M. Anilkumar, M.L. Stephen Raj & K. Jayaraman. 1998. Study on the pathogenicity of systemic ectodermal and mesodermal baculovirus and its detection in shrimp by immunological methods. *Aquaculture*. 160:31-45.
- Hamsah. 2004. *Peran pakan alami dalam penularan white spot syndrome virus (WSSV) pada benur udang windu, Penaeus monodon*. Tesis. Sekolah Pascasarjana. IPB. 58 hlm.
- Holt. J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley & S.T. William. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams and Wilkins, Ninth edition. Baltimore, Maryland, USA. 754 hlm.
- Irianto, A. 2003. *Probiotik akuakultur*. Gadjah Mada University Press. 125 hlm.
- Itami, T., M. Asano, Tokushige, K. Kubono, K. Kanagawa, A. Takeno, N. Nishimura, H. Maeda, M. M. Kondo & Y. Takahashi. 1998. Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Aquaculture*. 164:277-288.
- Isolauri, E., P.V. Kirjavainen & S. Salminen. 2002. Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation? *Gut*. 50(suppl11):iii54-iii59.
- Jha, R.K. & Z. R. Xu. 2005. Production of recombinant enveloped structural protein from the Chinensis WSSS isolate. *Indian journal of clinical biochemistry*. 20(2):136-141.

- Johansson, M. W., P. Keyser, K. Sritunyalucksana & K. Soderhal. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*. 191:45-52
- Ka Yin, L. 2004. *Current trends in the study of bacterial and viral fish and shrimp diseases*. World Scientific. Singapore. 421 hlm.
- Kimura, T., K. Yamano, H. Nakano, K. Momoyama, M. Hiraoka & K. Inouye. 1996. Detection of penaeid Rod-shaped DNA Virus (PRDV) by PCR. *Fish Pathology*, 31(2):93-98.
- Lewis, T. D & J.A.C. Leong. 2004. Viruses of fish. In: Ka Yin, Leung (ed) 2004. *Current trends in the study of bacterial and viral fish and shrimp diseases*. World Scientific. Singapore. 421 hlm.
- Lightner, D.V (Ed) (1996). *A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA. 96 hlm.
- Lisal, J. S. 2005. Konsep probiotik dan prebiotik untuk modulasi mikrobiota usus besar. *J. Med. Nus.* 4(26):256-262.
- Lo, C.F., J.H. Leu, C.H. Ho, C.H. Chen, S.E. Peng, Y.T. Chen, C.M. Chou, P.Y. Yeh, C.J. Huang, H.Y. Chou, C.H. Wang, & G.H. Kou. 1996. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Dis Aquat Org.* 25:133-141.
- Magbanua, Fe.O., K.T Natividad, V.P.Migo, C.G. Alfaiara, F.O. de la Pena, R.O Miranda, J.D. Albaladejo, E.C.B.Nadala, P.C.Loh & L.M.Tapay. 2000. White spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* in Philippines. *Dis Aquat Org.* 42:77-82.
- McClennen, C. 2004. *White spot syndrome virus; the economic, environmental and technical implications on the development of Latin American shrimp farming*. Master of Art Thesis. Tuft University. 106 hlm.
- Marteau, P. R., M. De Vrase, C. J. Cellier, & J. Schrezenmeir. 2001. Protection from gastrointestinal disease with the use of probiotics. *Am. J. Nutr.* 73(suppl):430S-6S.
- Moriarty, D. J. W. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture*. 164:351-358.



- Namikoshi, A., J.L.Wua, T.Yamashitaa, T. Nishizawab, T. Nishiokac, M. Arimoto, & K. Murogaa, 2004. Vaccination trials with *Penaeus japonicus* to induce resistance to white spot syndrome virus. *Aquaculture*. 229:25-35.
- Nejad, S.Z., M. H. Rezaei, G. A.Takami, D.L.Lovett, A.L. Mirvaghefi & M. Shakouri. 2004. *The effect of Bacillus sp. Bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival rate and growth in the Indian white shrimp Fenneropenaeus indicus*. M.Sc Thesis. Teheran University. 100 hlm.
- Nilsson, W. B., & M. S. Strom. 2002. Detection and identification of bacterial pathogens of fish in kidney tissue using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes. *Dis Aquat Org*. 48:175-185.
- OIE. 2005. Manual diagnostic tests of aquatic animals 2003. <http://www.oie.int/>. 16 juni 2005. pukul 11.00 WIB.
- Oginsky, E. L., & W. W. Umbreit. 1958. *An introduction to bacterial physiology*. Second edition. Toppan Company, Limited. Tokyo, Japan. 443 hlm.
- Peng, S.E., C.F. Lo, K.F. Liu & G.H. Kou. 1998. The transition from pre-patent to patent infection of white spot syndrome virus (WSSV) in *Penaeus monodon* triggered by pereopod excision. *Fish pathology*. 33(4):395-400.
- Rengpipat, S., W. Phianphak, S. Piyatiratitivorakul & P. Menasveta. 1998. Effect of probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture*. 167:301-313.
- Rengpipat, S., S. Rukpratanporn, S. Piyatiratitivorakul & P. Menasaveta. 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture*. 191:271-288.
- Rengpipat, S., A. Tunyanun, A.W.Fast, S.Piyatiratitivorakul & P. Menasveta. 2003. Enhanced growth and resistance to *Vibrio* challenge in pond-reared black tiger shrimp *Penaeus monodon* fed a *Bacillus* probiotic. *Dis Aquatic Org*. 55:169-173.

- Rukmi, D. P. 1999. *Pengaruh penyuntikan lipopolisakarida (LPS) asal dinding sel Vibrio harveyi pada udang windu (Penaeus monodon) terhadap aktivitas phenoloksidase dan fagositik hemositnya*. Skripsi. FKH. Institut Pertanian Bogor. 37 hal.
- Söderhäll, K. & L. Cerenius, 1992. Crustacean immunity. *Annual Rev. of fish diseases*. 2:3-21.
- Supamattaya, K., V. Chittivan, & M. Boonyaratpalin. 1998. Immunological factors in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius. In Flegel TW (ed). *Advances in shrimp biotechnology*. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok. 150 hlm.
- Sung, H.H., G.H. Kou & Y.L. Song. 1994. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathology*. 29:11-17.
- Van de Braak, K. 2002. *Haemocytic defense in black tiger shrimp (Penaeus monodon)*. Ph.D. Thesis, Wageningen University – with ref. – with summary in Dutch. Wageningen, The Netherlands. 159 hlm.
- Van Hulten, M.C.W., J. Witteveld, S. Peters, N. Kloosterboer, R. Tarchini, M. Fiers, H. Sandrink, R. K. Iankhors, and J. M. Vlak. 2001. The white spot syndrome virus DNA Genome sequence. *Rapid Communication. Virology*. 286:7-22.
- Verschuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos & W. Verstraete. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64(4):655-671.
- Villamil, L., C.Tafalla, A. Figueras, & B.Novoa. 2002. Evaluation of immunomodulatory effect of lactic acid bacteria in turbot (*Scophthalmus maximus*). *American Society for Microbiology*. 9(6):1318-1323.
- Witteveldt, J., C.C. Cifuentes, J.M. Vlak, & M. C. W. van Hultent. 2004. Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by oral vaccination. *Journal of Virology*. 78(4): 2057–2061.
- Yuwono, T. 2006. *Teori dan aplikasi polymerase chain reaction*. ANDI. Yogyakarta. 239 hlm.

Zuidema, D., M. C.W. Van Hulst, H. Marks, J. Witteveldt, & J. M. Vlak. 2004. Virus-Host Interactions of white spot syndrome virus in Ka Yin, L (ed). Current trends in the study of bacterial and viral fish and shrimp disease. *Molecular Aspect of Fish and Marine Biology*. 3: 237-255.





Lampiran II.1. Data kelangsungan hidup udang vannamei

Deskripsi	S2(a)	S3(a)	S4(a)	S6(a)	S7(u)	S8(u)	S13(e)	S14(e)	S16(u)	S18(a)	S19(u)	S23(e)	T1(a)	T2(a)	T3(e)	T4(a)	T6(u)	T8(u)	T9(u)	T10(u)	T11(a)	T14(a)	T15(u)	T16(u)
batch 1	6	6	6	0	6	25	6	0	6	25	6	39	43.8	6	6	0	6	0	33	13	6	6	6	6
batch 2	0	6	6	6	6	31.3	6	6	6	31.3	6	50	31.3	6	6	6	6	0	19	13	6	6	6	6
batch 3	6	6	6	0	6	31.3	6	0	6	25	6	31	18.8	6	6	0	6	6	31	6	6	6	6	6
TOTAL	12.6	18.9	18.9	6.3	18.9	87.6	18.9	6.3	18.9	81.3	18.9	120.7	93.9	18.9	18.9	6.3	18.9	6.3	83.1	32.3	18.9	18.9	18.9	18.9
MEAN	4.2	6.3	6.3	2.1	6.3	29.2	6.3	2.1	6.3	27.1	6.3	40.2	31.3	6.3	6.3	2.1	6.3	2.1	27.7	10.8	6.3	6.3	6.3	6.3
STDEV	3.6	0.0	0.0	3.6	0.0	3.6	0.0	3.6	0.0	3.6	0.0	9.4	12.5	0.0	0.0	3.6	0.0	3.6	7.8	3.9	0.0	0.0	0.0	0.0

lanjutan

Deskripsi	T17(u)	T18(e)	T20(e)	T21(u)	T23(u)	T26(u)	T28(u)	K20(u)	K23(e)	K26(a)	K34(u)	K37(a)	K39(u)	K41(a)	K45(e)	K48(e)	K49(e)	K60(e)	K61(e)	K52(a)	K53(a)	K54(a)	K55(a)	P1(e)
batch 1	31	33	6	25	44	63	19	6	6	6	6	6	6	6	6	62	6	6	6	63	6	6	6	6
batch 2	19	33	6	19	50	50	25	6	0	6	6	6	6	6	6	50	6	6	6	44	6	6	6	0
batch 3	31	20	6	31	44	63	31	6	6	6	6	6	6	6	6	63	6	6	6	63	6	6	6	6
TOTAL	81.4	86.0	18.9	75.1	137.6	175.0	74.8	18.9	12.6	18.9	18.9	18.9	18.9	18.9	18.9	174.8	18.9	18.9	18.9	188.5	18.9	18.9	18.9	12.6
MEAN	27.1	28.7	6.3	25.0	45.9	58.3	24.9	6.3	4.2	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	58.3	6.3	6.3	6.3	58.2	6.3	6.3	6.3	4.2
STDEV	7.2	7.5	0.0	6.3	3.6	7.2	6.1	0.0	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	7.2	0.0	0.0	0.0	11.0	0.0	0.0	0.0	3.6

lanjutan

Deskripsi	P3(a)	P4(s)	P5(e)	P7(e)	P10(e)	P11(a)	P13(e)	P15(e)	P16(a)	P18(a)	P17(a)	P18(u)	P19(u)	P20(u)	P23(u)	P25(e)	P27(e)	P29(u)	P32(e)	P33(a)	P36(e)	P38(e)	P42(a)	P43(a)	KNT
batch 1	6	6	6	25	40	63	6	6	63	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	38	6
batch 2	6	6	6	31	40	50	6	6	50	6	6	13	13	6	6	6	6	6	6	6	0	6	6	31	6
batch 3	6	6	6	25	33	63	6	6	63	6	6	38	13	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	31	13
TOTAL	18.9	18.9	18.9	81.3	113.0	175.0	18.9	18.9	175.0	18.9	100.1	32.3	18.9	18.9	18.9	18.9	18.9	18.9	18.9	18.9	12.6	18.9	18.9	100.1	25.0
MEAN	6.3	6.3	6.3	27.1	37.7	58.3	6.3	6.3	58.3	6.3	33.4	10.8	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	4.2	6.3	6.3	33.4	8.3
STDEV	0.0	0.0	0.0	3.6	4.0	7.2	0.0	0.0	7.2	0.0	3.6	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.6	0.0	0.0	3.6	4.0

**Lampiran II.2. Hasil perhitungan statistik efikasi kandidat probiotik lokal terhadap *white spot syndrome virus* (WSSV)**

**a) Perhitungan statistik efikasi kandidat probiotik lokal terhadap kelangsungan hidup udang vannamei**

**ANOVA**

**Kelangsungan hidup udang vannamei**

	<i>Sum of Squares</i>	<i>df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F</i>	<i>Sig.</i>
<i>Between Groups</i>	54512.928	71	767.788	51.807	.000
<i>Within Groups</i>	2134.087	144	14.820		
<i>Total</i>	56647.015	215			

Uji pembandingan berganda Dunnet tidak dapat ditampilkan untuk kelangsungan hidup udang vannamei karena data lebih dari 50 grup

**b) Perhitungan statistik efikasi kandidat probiotik lokal terhadap aktivitas fagositosis udang vannamei**

**ANOVA**

**Aktivitas pagositasi udang vannamei**

	<i>Sum of Squares</i>	<i>df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F</i>	<i>Sig.</i>
<i>Between Groups</i>	10730.995	71	151.141	20.115	.000
<i>Within Groups</i>	1082.000	144	7.514		
<i>Total</i>	11812.995	215			

Uji pembandingan berganda Dunnet tidak dapat ditampilkan untuk aktivitas pagositasi udang vannamei karena data lebih dari 50 grup.

**c) Perhitungan statistik efikasi kandidat probiotik lokal terhadap total hemosit udang vannamei**

**ANOVA**

**Total hemosit udang vannamei**

	<i>Sum of Squares</i>	<i>df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F</i>	<i>Sig.</i>
<i>Between Groups</i>	8472.370	71	119.329	13.488	.000
<i>Within Groups</i>	1274.000	144	8.847		
<i>Total</i>	9746.370	215			

Uji pembandingan berganda Dunnet tidak dapat ditampilkan untuk total hemosit udang vannamei karena data lebih dari 50 grup

Lampiran II.3. Data aktivitas fagosititas udang vannamei

Deskripsi	S2(e)	S3(a)	S4(e)	S6(e)	S7(u)	S9(u)	S13(s)	S14(s)	S16(u)	S18(a)	S18(u)	S23(s)	T1(a)	T2(a)	T3(s)	T4(a)	T6(u)	T8(u)	T9(u)	T10(u)	T11(a)	T14(a)	T16(u)	T16(u)
batch 1	5	9	9	0	8	20	9	0	5	18	11	27	25	9	8	0	5	0	18	8	6	5	8	5
batch 2	0	5	4	8	11	22	10	8	10	22	7	24	20	8	10	11	7	0	22	8	9	8	12	12
batch 3	8	8	7	0	5	18	8	0	5	20	8	28	22	10	7	0	6	9	20	8	12	12	10	8
TOTAL	13.0	23.0	20.0	8.0	24.0	60.0	27.0	8.0	20.0	60.0	26.0	78.0	67.0	27.0	25.0	11.0	18.0	9.0	60.0	24.0	27.0	25.0	30.0	25.0
MEAN	4.3	7.7	6.7	2.7	8.0	20.0	9.0	2.7	6.7	20.0	8.7	26.3	22.3	9.0	8.3	3.7	6.0	3.0	20.0	8.0	9.0	8.3	10.0	8.3
STDEV	4.0	2.3	2.5	4.6	3.0	2.0	1.0	4.6	2.9	2.0	2.1	2.1	2.5	1.0	1.5	6.4	1.0	5.2	2.0	0.0	3.0	3.5	2.0	3.5

lanjutan

Deskripsi	T17(u)	T18(a)	T20(s)	T21(u)	T23(u)	T26(u)	T28(u)	K20(u)	K23(s)	K26(e)	K34(u)	K37(e)	K39(u)	K41(a)	K45(s)	K48(s)	K49(s)	K60(s)	K61(s)	K62(a)	K63(a)	K64(a)	K65(a)	P1(s)
batch 1	16	27	9	17	23	30	20	8	8	11	7	9	10	9	11	25	8	12	8	28	8	8	8	8
batch 2	20	26	9	18	28	32	18	9	0	7	9	0	9	8	11	27	9	8	10	25	12	12	12	0
batch 3	19	21	10	20	23	25	15	12	9	12	8	8	9	12	10	24	10	7	9	30	8	8	8	9
TOTAL	55.0	74.0	28.0	55.0	75.0	87.0	53.0	29.0	17.0	30.0	24.0	17.0	28.0	27.0	32.0	76.0	27.0	27.0	27.0	83.0	28.0	28.0	28.0	17.0
MEAN	18.3	24.7	9.3	18.3	25.0	29.0	17.7	9.7	5.7	10.0	8.0	5.7	9.3	9.0	10.7	25.3	9.0	9.0	27.7	9.3	9.3	9.3	5.7	
STDEV	2.1	3.2	0.6	1.5	3.5	3.6	2.5	2.1	4.9	2.6	1.0	4.9	0.6	3.0	0.6	1.5	1.0	2.6	1.0	2.5	2.3	2.3	2.3	4.8

lanjutan

Deskripsi	P3(e)	P4(s)	P6(s)	P7(s)	P10(s)	P11(a)	P13(s)	P15(e)	P16(a)	P17(a)	P18(u)	P18(u)	P20(u)	P23(u)	P25(a)	P27(a)	P28(u)	P32(s)	P33(s)	P36(s)	P38(a)	P42(e)	P43(e)	KNT
batch 1	8	8	8	16	20	32	7	9	34	12	23	11	8	11	10	11	7	11	8	8	4	9	22	9
batch 2	11	11	10	20	16	30	9	11	28	11	16	8	8	9	9	9	9	9	9	0	3	11	19	12
batch 3	9	8	8	21	25	28	8	10	25	9	25	10	10	11	10	8	10	10	8	11	5	9	17	12
TOTAL	26.0	27.0	27.0	57.0	61.0	90.0	24.0	30.0	88.0	32.0	64.0	30.0	27.0	31.0	28.0	28.0	28.0	30.0	25.0	19.0	12.0	29.0	59.0	33.0
MEAN	9.3	9.0	9.0	19.0	20.3	30.0	8.0	10.0	29.3	10.7	21.3	10.0	9.0	10.3	8.7	9.3	8.7	10.0	8.3	6.3	4.0	9.7	19.3	11.0
STDEV	1.5	1.7	1.0	2.6	4.5	2.0	1.0	1.0	4.5	1.5	4.7	1.0	1.0	1.2	0.6	1.5	1.5	1.0	0.6	5.7	1.0	1.2	2.5	1.7

Lampiran II.4. Data total hemosit udang vannamei

Deskripsi	S2(e)	S3(a)	S4(a)	S6(e)	S7(u)	S9(u)	S13(s)	S14(s)	S16(u)	S18(a)	S19(u)	S23(s)	T1(a)	T2(e)	T3(s)	T4(a)	T6(u)	T8(u)	T9(u)	T10(u)	T11(a)	T14(e)	T15(u)	T16(u)
batch 1	10	11	11	0	8	21	11	0	10	20	10	23	19	10	11	0	11	0	19	11	10	11	9	8
batch 2	0	8	8	9	11	23	11	11	9	18	9	28	23	11	9	9	13	0	18	12	9	6	7	9
batch 3	8	12	8	0	7	20	10	0	11	28	11	22	16	9	10	0	6	12	18	12	7	12	7	11
TOTAL	18.0	31.0	27.0	9.0	27.0	64.0	32.0	11.0	30.0	66.0	30.0	73.0	58.0	30.0	30.0	9.0	30.0	12.0	55.0	35.0	28.0	31.0	23.0	28.0
MEAN	6.0	10.3	9.0	3.0	9.0	21.3	10.7	3.7	10.0	22.0	10.0	24.3	19.3	10.0	10.0	3.0	10.0	4.0	18.3	11.7	8.7	10.3	7.7	9.3
STDEV	5.3	2.1	1.7	5.2	2.0	1.5	0.6	6.4	1.0	5.3	1.0	3.2	3.5	1.0	1.0	5.2	3.6	6.9	0.8	0.6	1.5	2.1	1.2	1.5

Lanjutan

Deskripsi	T17(u)	T18(a)	T20(s)	T21(u)	T23(u)	T28(u)	T28(u)	K20(u)	K23(e)	K26(a)	K34(u)	K37(a)	K38(u)	K41(a)	K45(s)	K48(s)	K49(s)	K50(s)	K51(s)	K52(e)	K53(a)	K54(a)	K55(a)	P1(s)
batch 1	19	20	11	19	19	25	21	9	9	10	9	10	11	8	7	25	10	8	10	26	12	8	9	11
batch 2	21	24	9	23	25	30	19	13	0	10	9	12	6	9	11	29	5	9	11	23	12	11	9	0
batch 3	16	16	8	17	21	32	16	10	10	9	10	8	14	7	9	23	14	10	8	30	10	9	11	0
TOTAL	58.0	60.0	28.0	59.0	65.0	87.0	56.0	32.0	19.0	29.0	28.0	30.0	31.0	24.0	27.0	77.0	29.0	27.0	28.0	79.0	34.0	28.0	29.0	11.0
MEAN	18.7	20.0	9.3	19.7	21.7	29.0	18.7	10.7	6.3	9.7	9.3	10.0	10.3	8.0	9.0	25.7	9.7	9.0	9.7	26.3	11.3	9.3	9.7	3.7
STDEV	2.5	4.0	1.5	3.1	3.1	3.6	2.5	2.1	5.5	0.6	0.6	2.0	4.0	1.0	2.0	3.1	4.5	1.0	1.5	3.5	1.2	1.5	1.2	6.4

Lanjutan

Deskripsi	P3(a)	P4(s)	P5(s)	P7(s)	P10(s)	P11(a)	P13(s)	P15(e)	P16(a)	P17(a)	P18(u)	P19(u)	P20(u)	P23(a)	P25(a)	P27(a)	P29(a)	P32(s)	P33(a)	P36(s)	P38(a)	P42(a)	P43(a)	KNT
batch 1	8	10	11	17	18	28	5	10	27	11	16	9	11	8	11	12	12	9	11	8	13	12	22	12
batch 2	8	11	9	22	22	27	12	9	25	9	20	12	6	8	6	7	11	15	8	0	8	9	18	9
batch 3	13	9	9	20	18	26	8	6	30	10	18	10	10	5	10	10	12	7	9	13	10	14	20	13
TOTAL	29.0	30.0	29.0	59.0	59.0	81.0	25.0	25.0	82.0	30.0	54.0	31.0	27.0	21.0	27.0	29.0	35.0	31.0	28.0	21.0	31.0	35.0	60.0	34.0
MEAN	9.7	10.0	9.7	19.7	19.7	27.0	8.3	8.3	27.3	10.0	18.0	10.3	9.0	7.0	9.0	9.7	11.7	10.3	9.3	7.0	10.3	11.7	20.0	11.3
STDEV	2.9	1.0	1.2	2.5	2.1	1.0	3.5	2.1	2.5	1.0	2.0	1.5	2.6	1.7	2.6	2.5	0.6	4.2	1.5	6.6	2.5	2.5	2.0	2.1





**MAKALAH III**

**UJI EFIKASI BAKTERI PROBIOTIK LOKAL TERHADAP**

**PERSENTASE PENETASAN KISTA ARTEMIA**

## MAKALAH III

### UJI EFIKASI BAKTERI PROBIOTIK LOKAL TERHADAP PERSENTASE PENETASAN KISTA *Artemia salina* (Leach)\*

Tubagus Haeru Rahayu  
(0606037443)

#### ABSTRACT

In a previous study, a total of 19 bacterial isolates from shrimp ponds substrates in the Coast of North Java Island were selected as the potential probiotics for white shrimps *Litopenaeus vannamei*. The aim of this study was to examine the effect of the indigenous putative probiotics bacteria toward the hatching percentage of *Artemia salina* cysts. The decapsulated cysts of *A. salina* ( $1.8g.l^{-1}$ ) were hatched in the standard protocol for 24 hours incubation, which was previously added with  $10^6.ml^{-1}$  of 19 isolates of putative probiotic bacteria. The hatching percentage of *Artemia* cysts, total bacterial population and water quality were examined. All isolates of putative bacteria were not decreasing the hatching percentage of *A. salina* cysts statistically, i.e. (84.7%) to 87.3% compared to the control (85.7%). All bacterial isolates were able to suppress the *Vibrio* sp. which is commonly found in *Artemia* cysts. In addition, the 19 isolates of bacteria were stable in the total bacterial loading i.e. lower than  $10^2.ml^{-1}$  at time zero ( $T_0$ ), and  $10^7.ml^{-1}$  at time 24<sup>th</sup> hours ( $T_{24}$ ), and none decreased the water quality compared to the control.

**Keywords:** *Artemia salina*, hatching percentage, probiotic bacteria; *Vibrio*.

---

\* Makalah ini dalam format lain telah dipresentasikan dalam *International Conference Aquaculture Indonesia 2008*, 8-10 Juli 2008 di Bandar Lampung.

## PENDAHULUAN

Pakan merupakan salah satu faktor terpenting bagi keberhasilan produksi larva ikan dan udang, karena larva memiliki bukaan mulut yang kecil, dan perkembangan organ pencernaannya masih belum sempurna (Lavens & Sorgeloos, 1996). Pakan hidup (*live food*) merupakan alternatif untuk kebutuhan tersebut, karena memenuhi beberapa kriteria dasar sebagai pakan larva ikan dan udang (Rahayu 2001), yaitu: ukuran sesuai dengan bukaan mulut ikan/udang, mudah dideteksi oleh larva karena hidup dan mengandung nutrisi yang tinggi (Merchie 1996). Pakan hidup juga lebih atraktif karena selalu bergerak lambat serta memungkinkan dilakukan bioenkapsulasi (kapsul hidup) untuk tujuan tertentu seperti pengaturan nutrien, terapi, dan aplikasi probiotik (Lavens & Sorgeloos 2000).

Salah satu jenis pakan hidup yang sering digunakan dalam akuakultur adalah *Artemia* (Sorgeloos 1979). Keuntungan menggunakan *Artemia* adalah, sangat sederhana, dan mudah dibawa (praktis) karena dalam bentuk kista, dan *Artemia* merupakan organisme *osmoregulator*, yaitu mengatur tekanan osmosa sel tubuh sesuai dengan tekanan osmosa lingkungan, sehingga kandungan nutrisinya stabil karena dalam proses fisiologis tubuhnya selalu berupaya agar dalam kondisi tetap stabil (Van Stappen 1996).

*Artemia* merupakan *crustacea* tingkat rendah dan memiliki kekerabatan sangat dekat dengan udang (Van Stappen 1996) yang termasuk

dalam *phylum: Arthropoda, class: Crustacea, order: Anostraca, family: Artemidae*, dan *genus: Artemia*. *Artemia* umumnya hidup secara planktonik dalam perairan dengan kadar garam tinggi (Van Stappen 1996), antara 15-300 ppt, dan setelah mencapai ukuran dewasa hanya akan memproduksi kista ketika keadaan lingkungan memburuk (Van Stappen 1996), misalnya apabila kadar garam lebih dari 150 ppt dan kandungan oksigen rendah di bawah 2 mg/l. Kista baru akan menetas menjadi larva jika lingkungan sudah kembali membaik, yaitu: kadar garam kurang dari 150 ppt dan kandungan oksigen cukup. Ukuran *Artemia* yang baru menetas panjangnya sekitar 0,4 mm dengan berat sekitar 15 mikrogram (Sorgeloos 1979). *Artemia* menjadi dewasa setelah berumur 8 hari, dan dapat menghasilkan rata-rata 300 nauplii atau kista setiap 4 hari (Van Stappen 1996).

*Artemia* merupakan tingkat tropik dalam akuakultur yang strategis terutama dalam pembudidayaan udang karena *Artemia* banyak dipakai sebagai pakan hidup (*live food*) dalam pembenihan udang penaeid (Van Stappen 1996). Keunggulan *Artemia* sebagai pakan hidup di antaranya: memiliki nutrisi cukup tinggi, yaitu >40% protein (Sorgeloos 1979), ukuran tubuh yang relatif kecil (0,4 mm to 10 mm), dan memiliki pergerakan lambat sehingga mudah ditangkap oleh udang (Sorgeloos 1980).

*Artemia* dapat digunakan dalam bentuk bioenkapsulasi (kapsul hidup) (Dhert dkk. 1993), sehingga dapat digunakan sebagai mediator untuk aplikasi *enrichment* (pengkayaan dengan nutrisi tertentu), agen terapi, dan probiotik. *Artemia* dapat diaplikasikan dalam kegiatan akuakultur sebagai pakan hidup

dengan beberapa cara, yaitu: dekapsulasi kista, nauplii yang baru ditetaskan, meta nauplii, juvenil, dan *Artemia* dewasa (Sorgeloos 1979; Rahayu 2001).

Van Stappen (1996) menyatakan bahwa penetasan kista *Artemia* dipengaruhi oleh faktor abiotik yaitu kualitas air penetasan, dan faktor biotik yaitu, mikroorganisme patogen. Nauplii *Artemia*, mudah sekali terkontaminasi bakteri selama proses penetasan dan *enrichment* (pengkayaan dengan nutrisi tertentu), hingga dapat mencapai  $10^7$ /g (Austin & Allen, 1982). Bakteri yang sering menjadi kontaminan adalah *Vibrio* spp. ( $\pm$  43%), seperti *V. Harveyi*, *V. Parahaemolyticus*, *V. Fischery*, dan *Pseudomonas* ( $\pm$  34%) (Verdonck dkk. 1994). Bakteri-bakteri tersebut merupakan bakteri patogen untuk udang, sehingga nauplii *Artemia* dapat menjadi pembawa bakteri patogen yang dapat memicu penyakit atau kematian masal pada pemeliharaan larva udang (Van Stappen 1996). Bakteri *Vibrio* tersebut di atas sering ditemukan pada kista *Artemia* (Austin & Allen 1982) yang akan berkembang ketika menemukan kondisi yang normal saat penetasan kista *Artemia*. Populasi bakteri kontaminan dapat mencapai jumlah yang cukup membahayakan yaitu  $10^7$ - $10^9$ /ml dalam waktu 24 jam hingga 72 jam (Skjermo & Vadstein 1999). Bakteri tersebut kemungkinan besar dapat berpindah melalui nauplii *Artemia* ke udang yang dipelihara, karena hanya sedikit jumlah bakteri yang dapat dikurangi melalui pencucian kista sebelum dilakukan penetasan, sebagaimana bakteri akan terbawa pada saat proses penetasan (Van Stappen 1996).

Metode konvensional yang digunakan untuk mengontrol mikroorganisme patogen pada pakan hidup termasuk *Artemia* adalah desinfeksi melalui perendaman sebelum diberikan pada ikan/udang dan penggunaan antibiotik. Penggunaan metode tersebut dirasakan belum maksimal. Penggunaan zat-zat kimiawi seperti *chlorine*, *formaldehyde*, dan antibiotik terkadang toksik terhadap pakan hidupnya secara langsung, atau tidak berdampak signifikan terhadap penurunan populasi bakterinya (Munro dkk. 1993). Tinh (2000) melaporkan bahwa, meskipun penggunaan sinar ultra violet mampu menurunkan populasi bakteri sebesar 2 log unit pada aliran 1,5 liter per menit dalam kultur Rotifer, ternyata jumlahnya meningkat kembali dalam waktu 24 jam. Penggunaan antibiotik ternyata makin disadari dapat menimbulkan dampak lain, yaitu resistensi pada mikroorganisme (Gatesoupe 1999; Verschuere 2000).

Metode alternatif yang memiliki prospek adalah aplikasi probiotik (Verschuere dkk. 2000; Balcázar dkk. 2006). Probiotik didefinisikan sebagai penambahan mikroorganisme hidup yang memiliki pengaruh menguntungkan bagi inang melalui modifikasi bentuk asosiasi dengan inang atau komunitas mikroorganisme di lingkungan hidupnya; mengoptimalkan penggunaan pakan atau meningkatkan nilai nutrisinya; berkompetisi dengan mikroorganisme yang merugikan untuk nutrien, energi, dan tempat; meningkatkan respon imunitas; memperbaiki kualitas air, dan mampu berinteraksi dengan fitoplankton (Verschuere dkk. 2000).

Berdasarkan kondisi tersebut, maka sangat perlu meneliti kemungkinan aplikasi isolat kandidat probiotik terhadap kualitas penetasan yaitu persentase penetasan kista *A. salina* yang merupakan salah satu tingkat tropik pada udang. Penetasan kista *Artemia* sangat penting, karena merupakan langkah awal penyediaan pakan hidup untuk udang di unit pembenihan (*hatchery*) (Lavens & Sorgeloos 1996).

Dalam studi sebelumnya, diperoleh 19 isolat bakteri lokal hasil uji efikasi terhadap *white spot syndrome virus* (WSSV). Hasil pengujian berdasarkan kemampuan terapi pada udang vannamei yang terinfeksi WSSV, menunjukkan hasil lebih baik dibandingkan dengan kontrol (tanpa penambahan probiotik) terhadap beberapa parameter yang diuji yaitu: kelangsungan hidup udang, indeks imunitas, visualiasi histologi, dan deteksi terhadap WSSV dengan metode PCR. Tujuan penelitian adalah mengetahui pengaruh pemberian isolat bakteri terpilih terhadap persentase penetasan kista *A. salina*.

## **BAHAN DAN METODE**

### **BAHAN**

#### **Isolat bakteri**

Sebanyak 19 isolat terpilih digunakan (Lihat Makalah II) dalam penelitian ini. Isolat-isolat bakteri tersebut merupakan hasil seleksi sebelumnya pada udang terhadap WSSV berasal dari Serang (3 isolat, kode:

S<sub>9</sub>, S<sub>18</sub>, S<sub>23</sub>), Tangerang (8 isolat, kode: T<sub>1</sub>, T<sub>9</sub>, T<sub>17</sub>, T<sub>18</sub>, T<sub>21</sub>, T<sub>23</sub>, T<sub>26</sub>, T<sub>28</sub>), Pandeglang (6 isolat, kode: P<sub>7</sub>, P<sub>10</sub>, P<sub>11</sub>, P<sub>16</sub>, P<sub>18</sub>, P<sub>43</sub>), dan Karawang (2 isolat, kode: K<sub>48</sub>, K<sub>52</sub>). Isolat-isolat bakteri tersebut diambil dari 3 jenis substrat yaitu: air tambak udang, sedimen tambak udang, dan usus udang vannamei.

### **Kista *Artemia***

Kista *Artemia* yang digunakan adalah kista *A. salina* komersial (INVE, premium) dengan kemasan 425 gram per kaleng.

### **Air Laut**

Air laut yang digunakan adalah air laut yang diperoleh dari perairan Ancol, Jakarta Utara, diambil 1000 m dari pantai pada kedalaman 2-3 m. Salinitas air laut berkisar 25-30 ppt. Sterilisasi air laut menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi selama 20 menit.

### **Media dan bahan kimia**

Media kultur yang digunakan selama penelitian adalah: *marine agar* (Difco 2216), *tryptic soy broth* (TSB), dan *thiosulphate citrate bile salt sucrose* (TCBS) agar (Merck). Sementara bahan kimia dan bahan lainnya yang digunakan adalah NaCl (Merck), alkohol 70%, akuades, kapas, *bleech*, *natriumthiosulphate*, dan *spiritus*.



## Peralatan yang digunakan

Peralatan yang digunakan adalah: *laminar air flow cabinet* (Makita), *vortex* (Genie 2), *incubator* (Heraeus), *oven* (Heraeus), *autoclave* (Hirayama), mikroskop (*light microscope*), *spatel drigalsky*, *refrigerator* (Samsung), *spectrophotometer* (Genesys 11), *refractometer* (Atago-90), pH (Hanna instrument model H19143); *ammonium test kit* (Merck), *nitrit test kit* (Merck), *amoniak test kit* (Merck), *nitrat test kit* (merck), *termometer (model pen-like manual, skala 0.1° C)*, dan beberapa *glass ware* serta peralatan yang umum digunakan di laboratorium mikrobiologi.

## METODE

### Pemeliharaan Isolat bakteri

Isolat-isolat bakteri tersebut dipelihara dalam media *marine agar* miring dan disimpan pada suhu 4-10° C untuk *original culture*, *stock culture*, dan *working culture*. Pengayaan (*enriched*) isolat tersebut menggunakan media TSB (40 gram per liter), dan diinkubasikan 24 jam (suhu 30° C) (SOW, 2005) saat akan digunakan uji terhadap penetasan kista *A. salina*.

### Persiapan wadah penetasan

Botol plastik air mineral (1,5 l) digunakan sebagai wadah untuk menetasakan kista *A. salina*, dan ditempatkan secara terbalik dalam *water bath*. Pemanas akuarium (*heater*) yang dilengkapi dengan

pengudaraan/aerasi digunakan untuk menjaga suhu tetap stabil 28° C. Lampu TL 40 watt ( $\pm 2000$  lux) dipasang di atas wadah penetasan untuk sumber iluminasi (Van Stappen 1996).

### **Persiapan media Marine Agar dan TCBS Agar**

*Marine agar*, Difco 2216 (55,1 g/l) digunakan sebagai media kultur bakteri. Media agar dilarutkan dengan akuades sambil diaduk menggunakan *automatic magnetic stirrer*. Selanjutnya, disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121° C, dengan tekanan 15 psi selama 20 menit. Media agar yang telah disterilisasi, selanjutnya dituang dalam *petridish* sebanyak kurang lebih 20 ml kemudian dibiarkan mengeras. Media pertumbuhan bakteri *Vibrio*, adalah TCBS (*thio sulphate citrate bile salt sucrose*) agar. Pembuatan media sedikit berbeda dengan marine agar, yaitu sterilisasi dilakukan menggunakan *magnetic stirrer heater* hingga mencapai 300° C (Van Stappen 1996), sebelum dituang dalam cawan petri, dan dibiarkan mengeras.

### **Dekapsulasi kista *Artemia***

Dekapsulasi, yaitu proses penipisan cangkang kista *A. salina* mengikuti prosedur Van Stappen (1996). Seratus gram kista *A. salina* kering didekapsulasi sekaligus untuk mendapatkan kualitas yang serupa untuk semua perlakuan. Kista *A. salina* direndam dalam air tawar (air kran) selama 1 jam untuk rehidrasi. Kista kemudian dipindah ke dalam larutan *bleach* NaOCl (11-13% w/w). Lapisan kista diamati secara periodik menggunakan

mikroskop. Suhu larutan *bleach* dipertahankan tidak melebihi 40° C, dengan menambahkan es. Jika lapisan pada kista (*chorion*) telah menipis kemudian kista dicuci bersih, dan siap ditetaskan. Kista hasil dekapsulasi yang tersisa disimpan di *freezer*.

#### **Pembuatan larutan seri untuk penghitungan jumlah sel bakteri**

Larutan *saline* (NaCl 0,85%) digunakan untuk melarutkan bakteri dan pembuatan larutan pengenceran berseri. Pengenceran dibuat 10 kali (10 *times serial dilution*). Larutan *saline* dibuat dengan melarutkan 8,5 gram NaCl ke dalam 1 liter akuades. Larutan tersebut dimasukkan dalam tabung reaksi masing-masing 9 ml. Selanjutnya ditutup dengan kapas dan disterilisasi menggunakan autoklaf selama 20 menit pada suhu 121° C pada tekanan 15 psi. Setelah dingin larutan siap digunakan untuk menjadi media pengenceran bakteri.

#### **Efikasi kandidat bakteri probiotik lokal terhadap kualitas penetasan kista *A. salina***

Kista *A. salina* (1,8 gram per wadah) yang telah didekapsulasi, dimasukkan ke dalam wadah penetasan yang telah berisi air laut steril (salinitas 25 ppt) volume 1 liter. Pada masing-masing wadah penetasan sebelumnya telah ditambahkan satu kandidat probiotik yang merupakan isolat bakteri terpilih pada percobaan sebelumnya (uji efikasi terhadap WSSV) dengan konsentrasi 10<sup>6</sup>/ml. Persentase penetasan kista *A. salina*

dievaluasi setelah 24 jam proses penetasan, mengikuti prosedur Van Stappen (1996). Sebanyak 250 µl sampel dari masing-masing wadah penetasan diambil dengan menggunakan pipet ke dalam wadah kecil (*vial*). Kemudian naupli difiksasi dengan menambahkan dua tetes *Iugol*. Selanjutnya nauplii per wadah (6 sampel) dihitung dengan bantuan mikroskop cahaya. Rata-rata jumlah dari stadium *nauplii*, stadium *umbrella*, dan *embryo* dihitung berdasarkan Van Stappen (1996) sebagai berikut:

$$H\% = \frac{\text{Nauplii}}{\text{Nauplii} + \text{Umbrella} + \text{Embryo}} \times 100$$

#### **Penghitungan jumlah total bakteri pada media penetasan kista *A. salina***

Total bakteri dihitung setelah 24 jam masa inkubasi penetasan. Sebanyak 100 µl sampel air dari masing-masing wadah penetasan yang telah diencerkan secara seri (*serial dilution*) di-plate dengan menggunakan *spatel Drigalsky* di dalam *laminar air flow cabinet*. Media pertumbuhan bakteri yang digunakan adalah *Marine Agar* (Difco 2216; 55,1 g/l). TCBS agar digunakan khusus untuk mendeteksi bakteri *Vibrio* (Van Stappen, 1996). Penghitungan jumlah total bakteri dilakukan setelah 48 jam masa inkubasi pada suhu 30° C. Sel bakteri dihitung berdasarkan satuan pembentukan koloni (CFU/ml), yaitu rata-rata jumlah koloni dikali dengan rasio pengenceran dibagi dengan volume (ml) sampel yg diambil.

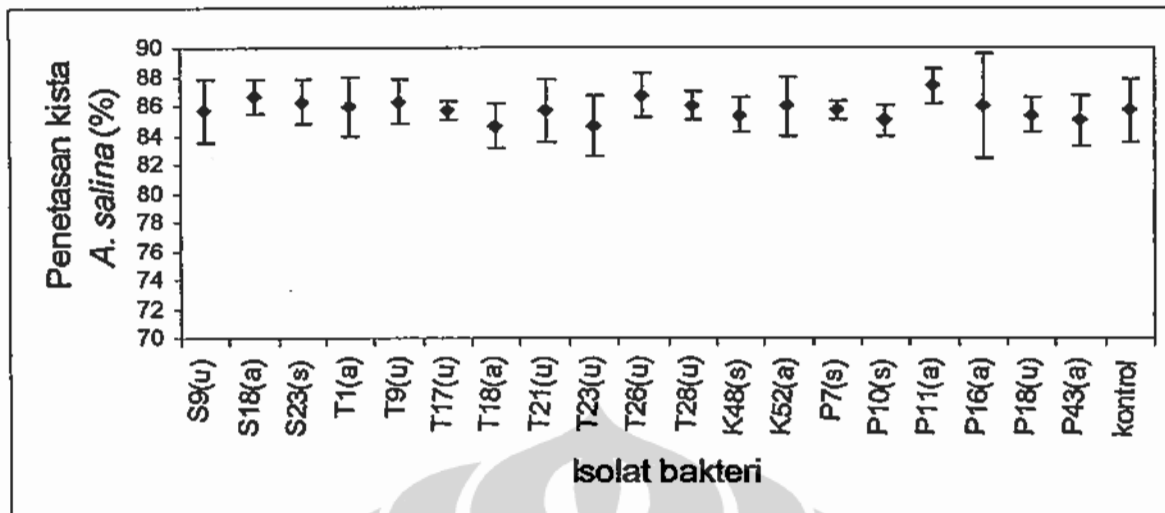
## Analisis statistik

Data persentase penetasan kista *A. salina* dianalisis dengan *analysis of variance* (Anova) dan dilanjutkan dengan uji pembandingan berganda *Dunnet* (kepercayaan 95%), jika terjadi perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ ). Data persentase penetasan kista *A. salina* dianalisis dengan menggunakan program komputer SPSS versi 13,0.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Persentase penetasan kista *A. salina*

Persentase penetasan kista *A. salina* disajikan pada Gambar III.1. Hasil pengujian menunjukkan isolat-isolat bakteri kandidat probiotik lokal yang diambil dari 4 daerah, yaitu Serang, Tangerang, Pandeglang, dan Karawang, baik dari air, sedimen maupun usus udang tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p > 0,05$ ) terhadap persentase penetasan kista *A. salina* (Lampiran III.1) dibandingkan dengan kontrol setelah 24 jam masa inkubasi penetasan. Persentase penetasan kista *A. salina* berkisar antara 84,7%-87,3%, sedangkan kontrol 85,7%.



Gambar III.1. Persentase penetasan kista *A. salina* setelah 24 jam masa Inkubasi.

Hasil pengujian menunjukkan bahwa 19 isolat bakteri kandidat probiotik tidak menurunkan persentase penetasan kista *A. salina* (tidak berpengaruh negatif). Persentase penetasan kista *Artemia* tidak menunjukkan perbedaan yang nyata secara statistik antara perlakuan yang ditambahkan isolat bakteri kandidat probiotik dengan perlakuan yang tidak diberikan bakteri. Hasil tersebut sangat menguntungkan untuk pengembangan isolat-isolat bakteri lokal yang akan dijadikan sebagai bakteri probiotik dalam akuakultur. Verschuere dkk. (2000) menyatakan bahwa salah satu mekanisme penentuan bakteri probiotik di samping memenuhi persyaratan terhadap target patogen dan biota tertentu yang diuji, juga harus tidak berdampak buruk terhadap tingkat tropik lainnya, sehingga merupakan satu kesatuan utuh. *A. salina*, dalam hal ini merupakan organisme yang

banyak digunakan sebagai pakan hidup (*live food*) pada *hatchery* udang (Van Stappen 1996).

Data Tabel III.1 menunjukkan bahwa persentase penetasan kista *A. salina* tidak meningkat dibandingkan dengan kontrol. Hal tersebut diduga karena kandidat bakteri yang diuji tidak memiliki kemampuan untuk memperbaiki kualitas air, yang merupakan salah satu faktor penentu dalam penetasan kista *Artemia*. Kualitas air seperti: suhu, pH, oksigen terlarut, dan turbiditas merupakan faktor penting dalam penetasan kista *A. salina* (Van Stappen 1996).

Boyd dkk. (1998) dan Rengpipat dkk. (1998) yang menyatakan bahwa tidak semua bakteri probiotik memiliki kemampuan memperbaiki kualitas air pemeliharaan ikan/udang. Beberapa bakteri seperti *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Cellulomonas* dan *Rhodopseudomonas* spp. tidak memperbaiki kualitas air pada pemeliharaan udang dan *Chanel catfish* saat dicoba secara tunggal maupun kombinasi beberapa bakteri tersebut. Beberapa bakteri yang efisien memperbaiki kualitas air adalah *Nitrosomonas* dan *Nitrobacter*. Bakteri tersebut merupakan bakteri nitrifikasi yang sering digunakan dalam filtrasi biologi (Boyd dkk. 1998).

Kemungkinan lain kandidat bakteri tidak dapat memperbaiki kualitas air media penetasan adalah karena kandidat probiotik bakteri terpilih tidak mampu berkompetisi ruang dan nutrisi (Verschuere dkk. 2000). Hal tersebut dimungkinkan karena Van Stappen (1996) dan Laven & Sorgeloos (1996) menyatakan, bahwa pada tahap awal penetasan, kista *A. salina* banyak

menghasilkan *glycerol*, yang merupakan hasil konversi karbohidrat dari embrio *A. salina* akibat mulainya proses metabolisme setelah kandungan air mencapai 60%. *Glycerol* merupakan substrat untuk bakteri yang memicu jumlah bakteri dalam media penetasan kista *A. salina*. Keberadaan *glycerol* dalam media penetasan dapat dilihat dengan terjadinya perubahan warna air penetasan menjadi *turbid/keruh* keputihan (Clegg 1962; Van Stappen 1996). Bakteri kandidat probiotik diduga tidak mampu mendominasi bakteri yang tidak diharapkan, yang merupakan salah satu model kerja (*action modes*) dari bakteri probiotik (Verschuere dkk. 2000; Geovany dkk. 2007). Beberapa bakteri yang tidak diharapkan sering dijumpai pada media penetasan *A. salina* di antaranya: *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Moraxella spp.*, *Cytophaga*, *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Morganella*, dan *Salmonella* (Straub & Dixon, 1993). Bakteri-bakteri tersebut dapat menjadi patogen terhadap ikan dan udang, seperti penyakit udang menyala (*luminescent disease*) yang disebabkan oleh *Vibrio harveyi* pada udang (Rengpipat dkk. 2000), atau dapat berdampak ke manusia saat ikan atau udang tersebut dikonsumsi, seperti *Salmonella* yang dapat menimbulkan penyakit *tifus* pada manusia.

Pengamatan selama percobaan terhadap air yang digunakan untuk menetas kista *A. salina*, mengindikasikan bahwa warna air mulai berubah keruh setelah 6 jam masa inkubasi penetasan. Van Stappen (1996) dan Rahayu (2001) menyatakan bahwa kista *A. salina* akan mulai menetas setelah 6 jam masa inkubasi. Pada periode tersebut mulai terlihat perubahan warna air media penetasan menjadi keruh. Perubahan yang cepat



disebabkan oleh proses dekapsulasi yang digunakan untuk menipiskan lapisan keras (*chorion*) kista (Van Stappen 1996). Jika tidak dilakukan proses dekapsulasi (menipiskan cangkang sebelum ditetaskan), kista baru terlihat mulai menetas setelah 10 -12 jam masa inkubasi penetasan (Van Stappen 1996).

Persentase penetasan kista *A. salina* akan meningkat seiring masa inkubasinya (Sorgeloos, 1979). Persentase penetasan 30% biasanya tercapai setelah 12 jam masa inkubasi, 80% penetasan setelah 20 jam masa inkubasi dan 90% penetasan setelah 24 jam masa inkubasi (Sorgeloos 1980; Rahayu 2001). Perbedaan rasio persentase penetasan, banyak ditentukan oleh kualitas dari kista *A. salina* dan prosedur teknis penetasan yang diterapkan, seperti densitas kista *A. salina*, iluminasi, sistem pengudaraan (aerasi), suhu air penetasan dan salinitas (Vanhaecke dkk. 1981).

#### **Evaluasi jumlah total bakteri pada media penetasan kista *A. salina***

Hasil pengujian terhadap jumlah total bakteri dari masing-masing perlakuan, menunjukkan hasil yang tidak berbeda dengan kontrol (tanpa penambahan kandidat probiotik). Hasil pengamatan terhadap jumlah total bakteri, menunjukkan kisaran  $<10^2$ /ml untuk  $T_0$  Jam dan sekitar  $10^7$ /ml untuk  $T_{24}$  jam. Bakteri spesifik *Vibrio* sp., ditemukan hanya pada perlakuan kontrol sebesar  $10^2$ /ml, pada  $T_{24}$  jam.

Kandidat bakteri probiotik mampu menekan bakteri *Vibrio* sp., sementara pada perlakuan *kontrol* masih terdeteksi adanya bakteri *Vibrio* sp.

sebesar  $10^2$ /ml. Keberhasilan bakteri probiotik menekan bakteri *Vibrio* sp., dinyatakan oleh Marques dkk. (2006) yang menambahkan bakteri probiotik *Bacillus* spp. dan *Aeromonas hydrophyla* ke dalam media pemeliharaan *A. salina*, dan mampu menekan bakteri patogen *Vibrio campbellii* dan *Vibrio proteolyticus*.

Patra & Mohamed (1998), menyatakan bahwa *A. salina* yang ditumbuhkan bersama probiotik *Saccharomyces boulardii* mampu menekan bakteri patogen *Vibrio harveyi*. Kelangsungan hidup *Artemia* mampu mencapai 90% dibandingkan dengan kontrol (tanpa probiotik) yang hanya mencapai 40% setelah 48 jam percobaan.

Laporan selanjutnya didokumentasikan oleh Verschuere dkk. (1999), yang melakukan percobaan menggunakan bakteri *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio proteolyticus*, dan *Pseudomonas fluoerescens* terhadap *Artemia*. Hasil percobaan yang dilakukannya menunjukkan bahwa ketiga bakteri tersebut berpengaruh terhadap komunitas mikroorganisme pada *Artemia*. *Total plate count* (TPC) dari air pemeliharaan menunjukkan perbedaan signifikan ( $P < 0,05$ ). Ketiga bakteri yang dicoba mampu menekan populasi bakteri hingga 2 log unit dibandingkan dengan kontrol (tanpa penambahan bakteri probiotik).

Verdonck dkk. (1991) menyatakan bahwa bakteri *Vibrio* spp. sering dijumpai mendominasi dan populasinya bisa mencapai  $\pm 43\%$  pada penetasan kista *Artemia*, diikuti oleh bakteri *Pseudomonas* ( $\pm 34\%$ ), dan bakteri lainnya seperti *Staphylococcus* dan *Aeromonas* (Austin & Allen 1982).

Bakteri *Vibrio* yang diisolasi dari udang penaeid, dilaporkan dapat menimbulkan kematian 40-80% pada nauplii *Artemia franciscana* pada densitas  $10^5$ - $10^6$  per ml (Soto-Rodriguez dkk. 2003). Hal tersebut mengindikasikan bahwa bakteri *Vibrio* sp. selain dikhawatirkan akan terbawa ke areal pertambakan menjadi bakteri yang oportunitas juga dapat menimbulkan mortalitas pada nauplii *Artemia* itu sendiri.

Keberhasilan kandidat probiotik menekan *Vibrio* sangat penting, mengingat bakteri *Vibrio* merupakan bakteri oportunistis yang dapat menjadi patogen pada pembudidayaan udang (Balcázar dkk. 2006). Hampir semua pembenihan udang menggunakan *Artemia* sebagai pakan hidup (*live food*), sehingga keberhasilan bakteri probiotik menekan bakteri *Vibrio* sangat membantu menekan patogen terbawa ke pembudidayaan udang di tambak (Dehasque dkk. 1993; Gatesoupe 1999).

Sembilan belas isolat terpilih diduga mampu berkompetisi dengan bakteri *Vibrio* sp. terhadap ruang dan nutrisi sehingga menekan pertumbuhannya pada media penetasan kista *A. salina*. Kemampuan berkompetisi tersebut sesuai dengan pernyataan Verschuere dkk. (2000) dan Geovanny dkk. (2007), yang menyatakan bahwa salah satu mekanisme kerja dari bakteri probiotik adalah kemampuan berkompetisi terhadap zat-zat kimia tertentu, nutrisi, dan tempat (Rengpipat dkk. 2003).

### Evaluasi terhadap kualitas air penetasan kista *A. salina*

Hasil pengamatan terhadap parameter kualitas air tidak menunjukkan perbedaan yang nyata antara pemberian kandidat probiotik lokal dibandingkan dengan kontrol (Tabel III.1).

Tabel III.1. Hasil pengukuran kualitas air media penetasan kista *A. salina*.

Parameter	Waktu (jam)	
	T <sub>0</sub>	T <sub>24</sub>
Temperatur (°C)	29.1	29-29,4
Salinitas (ppt)	25	25
pH	8,0	7,9-8,2
DO (mg/l)	4,6	4,5-4,8
Amoniak (mg/l)	0	0,2-0,5
Nitrit (mg/l)	0	0,2-0,5
Nitrat (mg/l)	0	0,2-2

Kisaran parameter suhu air, salinitas, pH dan oksigen terlarut (DO) relatif stabil antara periode sebelum penetasan dan setelah penetasan kista *A. salina*, kecuali parameter amoniak, nitrit dan nitrat yang terjadi kenaikan dibandingkan dengan pengamatan sebelum penetasan (T<sub>0</sub>). Namun demikian, kisaran tersebut masih merupakan kondisi normal bagi *Artemia* secara umum, mengingat *Artemia* merupakan organisme yang memiliki toleransi lebar terhadap parameter kualitas air, terutama salinitas dan oksigen terlarut (Sorgeloos 1979). *Artemia* memiliki sistem osmoregulasi sangat efisien, yaitu *Artemia* mampu mensintesis hemoglobin secara efisien, sehingga mampu mengambil oksigen dari air yang konsentrasi oksigennya

sangat rendah (Makridis dkk. 2001). Kemampuan tersebut merupakan bentuk pertahanan diri yang membuat *Artemia* dapat hidup di alam hingga saat ini.

Pada umumnya konsentrasi oksigen akan sangat terbatas ketika salinitas air tinggi, seperti halnya di perairan *Great Salt Lake* yang merupakan penghasil kista *Artemia* terbesar di dunia (Sorgeloos 1979). Kadar garam/salinitas pada danau tersebut dapat mencapai hingga 250 ppt (Sorgeloos 1980; Van Stapen 1996). Kemampuan adaptasi fisiologis yang tinggi terlihat dari tingginya persentase penetasan kista *A. salina* selama percobaan (Gambar III.1) yang mencapai lebih dari 80%.

## KESIMPULAN

Hasil studi menunjukkan bahwa 19 belas isolat bakteri probiotik lokal tidak menurunkan (tidak berpengaruh negatif terhadap) persentase penetasan kista *A. salina* dan mampu menekan populasi bakteri *Vibrio* sp. hingga 2 log unit dalam media penetasan kista *A. salina*.

## DAFTAR ACUAN

- Austin, B. & D.A. Allen. 1982. Microbiology of laboratory hatched brine shrimp (*Artemia*). *Aquaculture*. 26:369-383.
- Balcázar, J.L., I.de Blas, I.R.Zarzuela, D. Cunningham, D. Vendrell & J.L. Múszquiz. 2006. The role of probiotic in aquaculture. *Veterinary Microbiology*. 114:173-186.
- Boyd, C.E. 1998. *Water quality management for pond fish culture*. Elsevier. Alabama 318 hlm.

- Clegg, J.S. 1962. Free glycerol in dormant cysts of the brine shrimp, *Artemia salina* and its disappearance during development. *Biol. Bull.* **123**:295-301.
- Dehasque, M., L. Verdonck. & P. Sorgeloos. 1993. Effective suppression of bacterial bloom during hatching and enrichment of *Artemia* and its applicability in fish/shrimp hatchery. *Biol. Bull.* **123**:295-301.
- Dhert, P., P. Sorgeloos. & B. Deresse. 1993. Contribution towards a specific DHA enrichment in the live food *Brachionus plicatilis* and *Artemia* sp. *In*: Reinertsen. H., Dahle. L, A., Jorgeesen. L & Tvinnereim. K (eds) Proceedings of the first international conference on fish farming technology. Trondheim, Norway, pp. 105-109.
- Gatesoupe, F.J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. A review. *Aquaculture.* **180**:147-165.
- Geovanny, G.R.D., J.L. Balcazar. & M.A. Shen. 2007. Probiotic as control agents in aquaculture. A review. *Oceanic and coastal sea research.* **1**(6);76-79.
- Laven, P. & P. Sorgeloos. *Introduction.* *In* Lavens, P & Sorgeloos. P (eds). 1996. Manual on production and use of live food for aquaculture. FAO. *Fisheries Technical Paper.* **361**:1-7
- Laven, P. & P. Sorgeloos. 2000. The history, present and prospect of the availability of *Artemia* cysts for *Aquaculture.* **181**:397-403.
- Makridis, P., Ø. Bergh, J. Skjermo & O. Vadstein. 2001. Addition of bacteria bioencapsulated in *Artemia metanauplii* to a rearing system for halibut larvae. *Aquaculture International.* **9**:225-235.
- Marques, A., T. H. Thanh, P. Sorgeloos & P. Bossier. 2006. Use of microalgae and bacteria to enhance protection of gnotobiotic *Artemia* against different pathogens. *Aquaculture.* **258**:116-126
- Merchie, G. 1996. Use of nauplii and meta-nauplii *in*: Laven, P. & Sorgeloos, P. (eds). 1996. Manual on production and use of live food for aquaculture. FAO. *Fisheries Technical Paper.* **361**:107-137
- Munro, P.D., T. H. Birkbeck & A. Barbour. 1993. Bacterial flora of rotifers (*Brachionus plicatilis*): Evidence for a major location on the external surface and method for reducing the rotifer bacterial load. *In*: Fish Farming Technology. D. Reinertsen, Jorgensen & Tvinnereim (eds). Balkema. Rotterdam. 96 hlm.

- Patra, S.K. & K. S. Mohamed. 1998. *Enrichment of Artemia nauplii with the probiotic yeast Saccharomyces boulardii and its resistance against a pathogenic Vibrio*. In: Flegel (ed). 1998. *Advances in shrimp biotechnology*. Proceedings to the special session on shrimp biotechnology 5<sup>th</sup> Asian Fisheries Forum. Chiangmai, Thailand. 87 hlm.
- Rahayu, Tb. H. 2001. *Improvement of water quality during hatching and enrichment of Artemia*. M.Sc Thesis. Ghent University. Belgium. 84 hlm.
- Rengpipat, S., W. Phianphak, S. Piyatiratitivorakul & P. Menasveta. 1998. Effect of probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture*. 167:301-313.
- Rengpipat, S., A. Tunyanun, A. W. Fast, S. Piyatiratitivorakul & P. Menasveta. 2003. Enhanced growth and resistance to *Vibrio* challenge in pond-reared black tiger shrimp *Penaeus monodon* fed a *Bacillus* probiotic. *Dis Aquatic Org*. 55:169-173.
- Skjeremo, J. & O. Vadstein. 1999. Technique for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture*. 177:333-343.
- Sorgeloos, P. 1979. The brine shrimp, *Artemia salina*: a bottleneck in mariculture, *in*: FAO technical conference on aquaculture. 321-324. G., P. Sorgeloos, O. Roel & Jaspers. (Eds). *The brine shrimp Artemia. Ecology, culturing, use in aquaculture*. Universe Press. Wetteren, Belgium. 3:26-46.
- Sorgeloos, P. 1980. The use of brine shrimp *Artemia* in aquaculture. In Persoone. G., P. Sorgeloos, O. Roel & Jaspers. E. (eds). *The brine shrimps Artemia. ecology, culturing, use in aquaculture*. Universe press. Wetteren, Belgium. 3:26-46.
- SOW. N.M., R.D. Dauphin, D. Roblain, A. T. Huiro & P. Thonart. 2005. Polyphasic identification of a new thermotolerant species of lactic acid bacteria isolated from chicken faeces. *African Journal of Biotechnology*. 4(5):409-421.
- Soto-Rodriguez, S.A., A. Roque, M. L. Lizarraga-Partida, A.L. Guerra-Flores, B. Gomez-Gil. Virulence of luminous *Vibrios* to *Artemia fransiscana* nauplii. *Dis Aquat Org*. 53:231-240.

- Straub, D.V & B.A. Dixon. 1993. Bacteriological flora of the brine shrimp (*Artemia franciscana*) from a hypersaline pond in San Fransisco Bay, California. *Aquaculture*. **118**:309-313.
- Tinh, N.T. N. 2000. *Study on effect of selected single and mixed bacterial strains on the growth performance of the Rotifer, Brachionus plicatilis*. M.Sc. Thesis, Ghent University, Belgium. 135 hlm.
- Van Stappen, G. *Artemia*. 1996. *In*: Lavens, P & Sorgeloos. P (eds). 1996. Manual on production and use of live food for aquaculture. FAO. *Fisheries Technical Paper*. **361**:107-137.
- Vanhaecke, P., A. Cooreman. & P. Sorgeloos. 1981. International study on *Artemia* XV. Effect of light intensity on hatching rate of *Artemia* cysts from different geographical origin. *Aquaculture*. **30**:43-52.
- Verschuere, L., G. Rombaut, G. Huys, J. Dhont, P. Sorgeloos. & W. Verstraete. 1999. Microbial control of the culture of *Artemia* juveniles through preemptive colonization by selected bacterial strains. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**:2527-2533.
- Verschuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos. & W. Verstraete. 2000. Probiotic Bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **64**(4):655-671.
- Verdonck, L., M. Dehasque, J. Swing, P. Sorgeloos. & P. Leger. 1991. *The microbial environment of Rotifer (Brachionus plicatilis) and Artemia production system*. *In* Larvi'91 – Fish & Crustacean Larviculture Symposium. Laven. P, P. Sorgeloos, E. Jaspers, & F. Ollevier (eds). European Aquaculture Society. Special Publication (15). Gent. Belgium. 356 hlm.





**Lampiran III.1. Perhitungan statistik evaluasi efikasi probiotik bakteri lokal terhadap persentase penetasan kista *Artemia salina*.**

**ANOVA**

**Persentase penetasan kista *A. salina***

	<i>Sum of Squares</i>	<i>df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F</i>	<i>Sig.</i>
<i>Between Groups</i>	26.850	19	1.413	.482	.955
<i>Within Groups</i>	117.333	40	2.933		
<i>Total</i>	144.183	59			

Ket:

df. *degree of freedom*

Sig. : *significance*

**Uji Pembandingan berganda**

*Dependent Variable: hatching  
Dunnnett t (2-sided)*

(I) perlakuan	(J) perlakuan	<i>Mean Difference (I-J)</i>	<i>Std. Error</i>	<i>Sig.</i>	<i>95% Confidence Interval</i>	
					<i>Lower Bound</i>	<i>Upper Bound</i>
1.00	kontrol	.00000	1.39841	1.000	-4.2511	4.2511
2.00	kontrol	1.00000	1.39841	1.000	-3.2511	5.2511
3.00	kontrol	.66667	1.39841	1.000	-3.5845	4.9178
4.00	kontrol	.33333	1.39841	1.000	-3.9178	4.5845
5.00	kontrol	.66667	1.39841	1.000	-3.5845	4.9178
6.00	kontrol	.00000	1.39841	1.000	-4.2511	4.2511
7.00	kontrol	-1.00000	1.39841	1.000	-5.2511	3.2511
8.00	kontrol	.00000	1.39841	1.000	-4.2511	4.2511
9.00	kontrol	-1.00000	1.39841	1.000	-5.2511	3.2511
10.00	kontrol	1.00000	1.39841	1.000	-3.2511	5.2511
11.00	kontrol	.33333	1.39841	1.000	-3.9178	4.5845
12.00	kontrol	-.33333	1.39841	1.000	-4.5845	3.9178
13.00	kontrol	.33333	1.39841	1.000	-3.9178	4.5845
14.00	kontrol	.00000	1.39841	1.000	-4.2511	4.2511
15.00	kontrol	-.66667	1.39841	1.000	-4.9178	3.5845
16.00	kontrol	1.66667	1.39841	.934	-2.5845	5.9178
17.00	kontrol	.33333	1.39841	1.000	-3.9178	4.5845
18.00	kontrol	-.33333	1.39841	1.000	-4.5845	3.9178
19.00	kontrol	-.66667	1.39841	1.000	-4.9178	3.5845

a *Dunnnett t-tests treat one group as a control, and compare all other groups against it.*

Lampiran III.2. Data Persentase penetasan kista *Artemia* setelah 24 jam inkubasi

Deskripsi	S9(u)	S18(a)	S23(s)	T1(a)	T9(u)	T17(u)	T18(a)	T21(u)	T23(u)	T26(u)	T28(u)	K48(s)	K52(a)	P7(s)
batch 1	84	86	86	88	85	85	85	84	84	87	85	84	88	86
batch 2	85	86	85	86	88	86	86	88	87	85	87	86	84	85
batch 3	88	88	88	84	86	86	83	85	83	88	86	86	86	86
TOTAL	257.0	260.0	259.0	258.0	259.0	257.0	254.0	257.0	254.0	260.0	258.0	256.0	258.0	257.0
MEAN	85.7	86.7	86.3	86.0	86.3	85.7	84.7	85.7	84.7	86.7	86.0	85.3	86.0	85.7
STDEV	2.1	1.2	1.5	2.0	1.5	0.6	1.5	2.1	2.1	1.5	1.0	1.2	2.0	0.6

lanjutan

Deskripsi	P10(s)	P11(a)	P16(a)	P18(u)	P43(a)	kontrol
batch 1	86	88	90	86	87	85
batch 2	84	86	83	84	84	84
batch 3	85	88	85	86	84	88
TOTAL	255.0	262.0	258.0	256.0	255.0	257.0
MEAN	85.0	87.3	86.0	85.3	85.0	85.7
STDEV	1.0	1.2	3.6	1.2	1.7	2.1



**MAKALAH IV**

**IDENTIFIKASI DAN ANALISIS FILOGENETIK BAKTERI PROBIOTIK LOKAL  
UNTUK UDANG VANNAMEI (*Litopenaeus vannamei*) (Boone)  
BERDASARKAN DATA SEQUENCE GEN 16S RIBOSOMAL RNA**

## MAKALAH IV

# IDENTIFIKASI DAN ANALISIS FILOGENETIK BAKTERI PROBIOTIK LOKAL UNTUK UDANG VANNAMEI (*Litopenaeus vannamei*) (Boone) BERDASARKAN DATA SEQUENCE GEN 16S RIBOSOMAL RNA\*

Tubagus Haeru Rahayu  
(0606037443)

### ABSTRACT

In a preliminary study, a total of 19 indigenous local bacterial isolates were proven to be potential probiotics for white shrimps *Litopenaeus vannamei*. These isolates were obtained from water, sediment, and the guts of healthy adult shrimps from Pandeglang, Serang, Tangerang, and Karawang. The aim of this study was to elucidate the identity of bacterial isolates based on 16S ribosomal RNA gene sequence analysis. PCR amplification of 16S ribosomal RNA gene was carried out using bacterial universal primers 9F and 1510R, and PCR products were sequenced directly by automated DNA sequencer. Homology search for sequence data was performed by Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) program through website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. The alignment of sequences from 19 isolates with related sequences obtained from DNA database was carried out by Clustal X. Neighbor-joining method with Kimura two-parameters was used for reconstruction of phylogenetic tree with *E. coli* as an out group. Identification of 19 isolates based on partial sequence of 16S ribosomal RNA gene showed that they belong to two genera e.g. *Bacillus* and *Micrococcus*. The 19 bacterial isolates consist of *Bacillus flexus* (3), *B. megaterium* (1), *B. pumilus* (5), *B. subtilis* (1), *Bacillus* sp. (7), *Micrococcus luteus* (1) and *Micrococcus* sp. (1).

**Key-words:** *Bacillus*; *Micrococcus*; 16S ribosomal RNA gene: phylogenetic analysis, sequencing.

---

\* Makalah ini dalam format lain telah di-submit pada Jurnal Microbiology Indonesia.

## PENDAHULUAN

Pada penelitian terdahulu, telah dilakukan seleksi terhadap isolat-isolat bakteri lokal dan diperoleh 19 isolat bakteri lokal potensial sebagai probiotik untuk udang vannamei. Seleksi tersebut didasarkan pada seleksi kelangsungan hidup udang vannamei, kemampuan terapi pada udang vannamei yang terinfeksi WSSV dan uji efikasi terhadap tropik level berbeda dalam akuakultur (*Artemia*).

Probiotik didefinisikan sebagai penambahan mikroorganisme tertentu yang memiliki pengaruh menguntungkan bagi inang melalui modifikasi bentuk keterikatan (asosiasi) dengan inang atau komunitas mikroorganisme lingkungan hidupnya (Verschuere dkk. 2000). Bakteri probiotik pada akuakultur telah berhasil digunakan sebagai agen pengendali mikroorganisme yang merugikan terhadap ikan atau udang yang dipelihara (Irianto, 2003). Bakteri probiotik merupakan alternatif penanggulangan terhadap penyakit, terutama *white spot syndrome virus (WSSV)*, dan banyak diterapkan untuk mengantisipasi isu global tentang akuakultur yang berkelanjutan (*sustainable aquaculture*) dan keamanan pangan (Gatesoupe 1999).

Beberapa genera yang telah digunakan sebagai bakteri probiotik dalam akuakultur di antaranya: kelompok bakteri asam laktat (BAL) (Verschuere dkk. 2000), *Vibrio* (Balcázar dkk. 2006), *Bacillus* (Rengpipat dkk.

2003), *Aeromonas*, *Flavobacterium* dan *Micrococcus* (Geovanny 2007; Gatesoupe 1999).

Bakteri probiotik memiliki beberapa mekanisme kerja pada inangnya yaitu: memproduksi komponen penghambat, berkompetisi dengan mikroorganisme patogen untuk zat kimia atau nutrien tertentu (Gatesoupe 1997), atau energi yang ada, meningkatkan respon imunitas (Rengpipat dkk. 1998), memperbaiki kualitas air dan berinteraksi dengan fitoplankton (Verschuere dkk. 2000; Rengpipat dkk. 2003). Metode yang akurat sangat diperlukan untuk mengetahui identifikasi dan karakter bakteri yang dapat digunakan sebagai probiotik (Verschuere dkk. 2000; Geovanny 2007).

Identifikasi jenis bakteri dalam kegiatan akuakultur pada awalnya digunakan untuk diagnosis penyakit ikan dan udang (Lightner 1996). Identifikasi yang akurat diperlukan untuk mengurangi kesalahan dalam menentukan langkah-langkah penanggulangan penyakit yang berkembang, sehingga dapat menekan kerugian usaha akibat serangan penyakit (Nilsson & Strom 2002).

Metode identifikasi bakteri dapat dilakukan secara konvensional dan secara molekular. Metode konvensional didasarkan pada informasi fenotipik seperti karakter morfologi, fisiologi dan biokimia (Cowan 1974; Holt dkk. 1994). Meskipun lebih murah, metode konvensional tersebut memiliki beberapa kelemahan, yaitu: pekerjaan yang dilakukan banyak (*laborious*), membutuhkan waktu relatif lama (*time consuming*), dan kurang akurat (*less accuracy*) (Nilsson & Strom 2002).

Metode alternatif untuk mengidentifikasi bakteri dan sekaligus dapat mengatasi kelemahan dari metode konvensional tersebut adalah metode molekular yang didasarkan pada informasi karakter genotip, yaitu menggunakan asam nukleat (DNA dan RNA) sebagai sumber informasi (Tirola dkk. 2002). Keunggulan metode berdasarkan informasi genotip dibandingkan dengan metode berdasarkan informasi fenotip adalah menggunakan DNA dari organisme target; hasil identifikasi dapat diperoleh dalam waktu yang singkat, yaitu dapat diselesaikan dalam 24 jam, dan memiliki tingkat akurasi yang tinggi (Angert dkk. 1998).

Metode molekular yang umum digunakan untuk indentifikasi bakteri adalah berdasarkan analisis *sequence* gen 16S *ribosomal* RNA (Madigan dkk. 2000). Gen 16S *ribosomal* RNA merupakan gen yang terdapat pada *small sub unit* (SSU) dari *ribosom* bakteri yang terdapat pada sitoplasma bakteri. Gen tersebut berukuran 30 S (Svedberg), memiliki 1541 nukleotida. Gen 16S *ribosomal* RNA memiliki beberapa keunggulan di antaranya: terdapat secara umum (*universally present*) pada bakteri, konstan dalam menjalankan fungsinya (*functionally constant*), memiliki *sequence database* yang cukup, yaitu lebih dari 97.000 data *sequence* di *GenBank* pada tahun 2004 yang dapat diakses dengan mudah melalui internet dan mudah dikerjakan, yaitu mudah diamplifikasi (Angert dkk. 1998).

Metode identifikasi berdasarkan *sequence* gen 16S *ribosomal* RNA dapat digunakan untuk mengidentifikasi bakteri hingga ke tingkat spesies. Identitas bakteri ditentukan dengan menyejajarkan (*aligned*) *target sequence*



dengan gen terdekat yang diperoleh dari *GenBank* menggunakan program *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (Macrae 2000; Okamoto dkk. 2001). Hasil *sequence* gen 16S *ribosomal* RNA dapat digunakan untuk membangun pohon filogenetik dengan metode *neighbour-joining* (Li & Graur 1991). Program yang digunakan dalam analisis pohon filogenetik adalah *Clustal X* (Saitou & Nei 1987; Holmes 2003). Keluaran dari program tersebut ditampilkan dalam model menyerupai pohon (*tree-like style*) (Holmes 2003).

Penelitian ini bertujuan memperoleh informasi identitas 19 isolat bakteri probiotik lokal berdasarkan analisis *sequence* gen 16S *ribosomal* RNA dan mengetahui hubungan isolat-isolat tersebut dengan spesies bakteri yang sudah diketahui.

## **BAHAN DAN METODE**

### **BAHAN**

#### **Isolat bakteri**

Isolat bakteri yang digunakan untuk diidentifikasi sebanyak 19 isolat (Tabel IV.1) yang berasal dari Serang, Tangerang, Karawang, dan Pandeglang. Isolat-isolat bakteri tersebut berasal dari tiga substrat berbeda yaitu: air dan sedimen tambak udang, dan usus udang vannamei.

**Tabel IV.1.** Isolat-isolat bakteri yang akan diidentifikasi berdasarkan analisis *sequence* gen 16S *ribosomal* RNA.

No	Daerah sampling	Jumlah Isolat	Kode isolat bakteri
1	Serang	3 isolat	S <sub>9</sub> , S <sub>18</sub> , S <sub>23</sub>
2	Tangerang	8 isolat	T <sub>1</sub> , T <sub>9</sub> , T <sub>17</sub> , T <sub>18</sub> , T <sub>21</sub> , T <sub>23</sub> , T <sub>26</sub> , T <sub>28</sub>
3	Karawang	2 isolat	K <sub>48</sub> , K <sub>52</sub>
4	Pandeglang	6 isolat	P <sub>7</sub> , P <sub>10</sub> , P <sub>11</sub> , P <sub>16</sub> , P <sub>18</sub> , P <sub>43</sub>

### Media dan bahan kimia

Medium yang digunakan untuk isolasi dan pemeliharaan adalah: *marine agar* (Difco). Bahan kimia dan bahan lainnya yang digunakan adalah: *nuclease free water*, *PCR master mix* (Ready To Go), *DNA ladder* (1 Kb, Promega), *loading dye* (Blue/orange 6x, Promega), *TAE buffer* 1X, *Gel agarose* 1%, *ethidium Bromide*, *Tris acetate EDTA* pH 8.0 1x, 3M *sodium acetate* pH 5.5, etanol 100%, etanol 70%, *big dye terminator* (BDT) *ready reaction Mix* V.3.1, *buffer sequence*, 125mM EDTA, *Hi-di formamide*, *ultra pure water* (milli-Q), tabung mikro (1.5 ml dan 0.2 ml), dan *parafilm*.

### Peralatan

Peralatan yang digunakan adalah: PCR (Perkin-Elmer GenAmp PCR System 9600), *centrifuge* (Eppendorf 5415C), *vortex* (Genie 2), *incubator* (Heraeus), *laminar air flow cabinet*, *autoklaf* (Hirayama), elektroforesis (Mupid-EX, 25-135 V), *gel doc UV transilluminator* (BioRad), *automated DNA*

*sequencer* (ABI 310 PRISM Genetic Analyzer), dan *incubator* (Heraeus, 0-70° C).

## **METODE**

### **Persiapan isolat untuk isolasi DNA**

Isolat bakteri yang akan digunakan untuk isolasi DNA ditumbuhkan pada medium *Marine Agar* (Difco) dan diinkubasikan pada suhu 30° C sampai tahapan fase log (selama 48 jam).

### **Persiapan *template* DNA untuk PCR**

*Template* DNA disiapkan berdasarkan metode Sjamsuridzal & Oetari (2003), yaitu metode perebusan (*boiling method*). Metode pembekuan dan pencairan (*freeze-thawing*) digunakan untuk sel yang sulit dilisiskan yang akan dijadikan *Template* DNA. Isolat-isolat bakteri dari *petridish* yang telah ditumbuhkan diambil dengan menggunakan ujung pipet dan dimasukkan ke dalam tabung mikro (1,5 ml) berisi 500 µl *nuclease free water*. Suspensi sel dihomogenkan dengan vortex selama 1 menit. Tutup tabung mikro kemudian ditutup menggunakan parafilm dan dikunci dengan *lid lock* sebelum direbus selama 20 menit. Setelah direbus, sel disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang dihasilkan digunakan sebagai *template* DNA yang siap digunakan untuk reaksi PCR (*polymerase chain reaction*).

### **Amplifikasi gen 16S *ribosomal* RNA**

Gen 16S *ribosomal* RNA di amplifikasi menggunakan metode PCR (Yuwono 2006) menggunakan primer bakteri universal, didasarkan atas gen 16S *ribosomal* RNA bakteri *Eschericia coli* pada posisi 9F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan 1510R (5'GGCTACCTTGTTACGA-3').

Campuran reaksi PCR terdiri dari primer 9F dan 1510R (konsentrasi 20µM) masing-masing 1,25 µl, *Ready To Go* (RTG) yang telah dilarutkan dalam 15 µl *nuclease free water* dan *template* DNA 7,5 µl. Proses amplifikasi gen 16S *ribosomal* RNA menggunakan PCR Perkin Elmer GenAmp 9600.

Kondisi PCR terdiri dari denaturasi awal pada suhu 95° C selama 3 menit sebanyak satu siklus, dilanjutkan dengan 35 siklus yang terdiri dari denaturasi 95° C selama 30 detik; *annealing*, 55° C selama 15 detik; ekstensi 72° C selama 1 menit; dan ekstensi akhir 72° C selama 5 menit.

### **Elektroforesis produk PCR**

Elektroforesis produk PCR berdasarkan Lightner (1996) menggunakan gel *agarose* 1% dan buffer TAE 1X pada voltase 100 volt selama 25 menit. Selanjutnya gel *agarose* direndam dalam larutan *Ethidium Bromide* (0,5%; v/v) selama 10 menit. Visualisasi produk PCR menggunakan *Gel Documentation Ultra Violet (UV) transilluminator*. DNA marker (100 pb) digunakan sebagai penanda ukuran DNA.

### **Purifikasi produk PCR**

Produk PCR dipurifikasi dengan metode presipitasi Etanol dan Sodium Asetat untuk menghilangkan kelebihan primer. Produk PCR (20 µl) terlebih dahulu ditransfer ke tabung mikro (1,5 ml) baru. Selanjutnya ditambahkan 2 µl, 3M *Sodium Acetate* (CH<sub>3</sub>COONa) pH 5,5 dan 50 µl Etanol 100% dingin. Setelah dihomogenkan menggunakan pipet, sampel disimpan di *freezer* selama 30 menit, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang secara perlahan menggunakan pipet mikro. Selanjutnya ditambahkan 70 µl *Etanol* 70% dingin dan dihomogenkan menggunakan pipet mikro secara perlahan. Selanjutnya disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang menggunakan pipet mikro. DNA dikeringkan pada temperatur 50° C selama 30 menit. Sebanyak 15 µl *nuclease free water* ditambahkan ke dalam tabung untuk mensuspensikan DNA, selanjutnya siap digunakan sebagai "*template DNA*" untuk reaksi *Cycle Sequencing*.

### **Reaksi *cycle sequencing***

Campuran reaksi *cycle sequencing* sesuai dengan prosedur Applied Biosystem Inc. yang terdiri dari *Big Dye Terminator Ready Reaction Mix V.3.1* sebanyak 1 µl, primer 9F (20 µM) 0,5 µL, *sequencing buffer* 7 µl, *nuclease free water* 0.5 µl dan produk PCR 1 µl. Kondisi PCR terdiri dari denaturasi awal pada suhu 96° C selama 1 menit sebanyak 1 siklus, diikuti

dengan 30 siklus yang terdiri dari denaturasi 96° C selama 10 detik; *annealing*, 50° C selama 5 detik; dan ekstensi 72° C selama 1,5 menit.

#### **Purifikasi produk *cycle sequencing***

Produk *cycle sequence*, dipurifikasi untuk menghilangkan kelebihan *big dye terminator*, *primer*, dan *mineral* menggunakan metode presipitasi Etanol. Sampel ditransfer ke tabung mikro (1,5 ml) baru, selanjutnya ditambahkan 2 µl 125 mM EDTA dan 50 µl etanol 100% dingin. Setelah dihomogenkan menggunakan pipet mikro secara perlahan, diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit, selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 5.000 rpm selama 30 menit. Supernatan dibuang menggunakan pipet mikro secara perlahan, kemudian ditambahkan 70 µl etanol 70% dingin dan dihomogenkan menggunakan pipet mikro secara perlahan. Sampel selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 5.000 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang menggunakan pipet mikro secara perlahan. DNA dikeringkan menggunakan inkubator pada temperatur 50° C selama 30 menit.

#### ***Sequencing* gen 16S *ribosomal* DNA**

Produk PCR hasil *cycle sequencing* didenaturasi dengan menambahkan 15 µl *hi-di formamide*, selanjutnya dihomogenkan menggunakan pipet mikro secara perlahan. Sampel selanjutnya ditransfer ke tabung mikro 0,2 µl, dan dilanjutkan dengan denaturasi pada suhu 95° C selama 2 menit, dan sampel segera didinginkan di dalam es.

Produk PCR gen 16S *ribosomal* RNA yang telah didenaturasi selanjutnya dimasukkan (*loading*) ke dalam *Automated DNA sequencer*, dengan mengikuti prosedur Applied Biosystem Inc. Sebanyak 13 µl sampel dimasukkan dalam tabung mikro 0,5 ml, kemudian ditutup dengan *septa*. Sampel selanjutnya diletakkan pada sampel *tray* dan selanjutnya mengikuti protokol alat ABI PRISM 310 Genetic Analyzer.

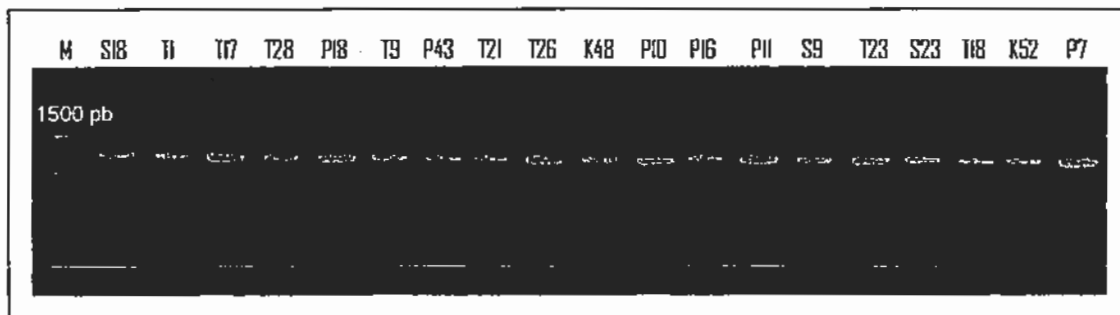
### **Analisis hasil *sequence* gen 16S *ribosomal* RNA dan analisis filogenetik**

*Sequence* yang diperoleh dibandingkan dengan data *GenBank* menggunakan program *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (Macrae 2000) untuk mendapatkan identitas isolat bakteri. Hasil *sequence* gen 16S *ribosomal* RNA dari 19 isolat dan spesies-spesies yang berdekatan (yang diperoleh dari DNA database) digunakan untuk membuat pohon filogenetik berdasarkan metode *neighbour-joining* dengan program *Clustal X* (Saitou & Nei, 1987; Holmes, 2003).

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Amplifikasi gen 16S *ribosomal* RNA**

Hasil elektroforesis terhadap gen 16S *ribosomal* RNA menggunakan primer 9F dan 1510R (Gambar IV.1) menunjukkan visualisasi pita DNA berukuran 1.500 pb yang jelas, tebal dan seragam dari 19 isolat terpilih.



**Gambar IV.1.** Visualisasi produk PCR gen 16S *ribosomal* RNA dari isolat-isolat bakteri terpilih menggunakan primer 9F dan 1510R (M: *marker DNA ladder* 100 pb; pb: pasangan basa).

Ukuran *fragment* gen 16S *ribosomal* RNA yang sama, menunjukkan bahwa Gen 16S *ribosomal* RNA tidak banyak variasi (*polymorphism*), artinya gen 16S tersebut dapat dikatakan sangat identik (*conserved*). Li & Graur (1991) menyatakan bahwa, bakteri memiliki *multi copy* gen 16S *ribosomal* RNA, sehingga mudah diamplifikasi. Satu unit gen *ribosomal* terdiri dari 200 *copy tandem repeat*, dan untuk analisis molekular, cukup satu dari 200 *copy* identik *tandem repeat* saja. Di samping itu *region/area* dari *ribosomal* RNA dapat digunakan untuk membandingkan filogenetik pada banyak tingkatan taksonomik.

Gen 16S *ribosomal* RNA merupakan bagian dari gen pengkode protein, yaitu gen yang berfungsi sebagai perekam (*transcription*) yang menghasilkan *copy* RNA dari gen dan penerjemah (*translation*) yang menghasilkan sintesa protein. Li & Graur (1991) menyatakan bahwa hingga saat ini, terdapat tiga tipe gen yang telah diketahui, yaitu: gen pengkode protein, gen penentu RNA



(*RNA-specifying genes*) dan gen pengatur (*regulatory genes*). Gen pengkode protein dan gen penentu, sering disebut sebagai gen struktural (*structural genes*), yaitu: *sequence* nukleotida DNA yang berfungsi sebagai pengkode protein atau penentu molekul RNA.

Kondisi tersebut di atas, yaitu ukuran *fragment* gen 16S yang sama, sehingga tidak banyak variasi (*conserved*), dan terdapat secara universal pada *prokaryote*, maka banyak digunakan sebagai pengukur jarak evolusi pada bakteri secara molekular (*molecular chronometer*) (Brown 1999). Metode tersebut dikembangkan, sebagai alternatif metode identifikasi konvensional yang berdasarkan informasi penotifik yang kurang akurat.

#### **Hasil identifikasi isolat bakteri probiotik terpilih**

*Sequence* gen 16S *ribosomal* RNA dari 19 isolat bakteri terpilih yang diperoleh, dibandingkan dengan *sequence* terdekat yang ada dengan program BLAST di GenBank, menunjukkan bahwa isolat terpilih berasal dari dua genera, yaitu *Bacillus* dan *Micrococcus* (Tabel IV.2). Genus *Bacillus* terdiri dari *Bacillus* sp. (kode: P<sub>11</sub>, S<sub>23</sub>, T<sub>18</sub>, K<sub>52</sub>, P<sub>7</sub>, T<sub>21</sub>, T<sub>26</sub>), *B. pumilus* (kode: P<sub>18</sub>, S<sub>18</sub>, T<sub>17</sub>, T<sub>28</sub>, T<sub>1</sub>), *B. subtilis* (kode: T<sub>9</sub>), *B. megaterium* (P<sub>43</sub>), *B. flexus* (kode: P<sub>10</sub>, P<sub>16</sub>, K<sub>48</sub>), sedangkan genus *Micrococcus* terdiri dari *Micrococcus* sp. (kode: T<sub>23</sub>), dan *Micrococcus luteus* (kode: S<sub>9</sub>).

**Tabel IV.2.** Identitas isolat bakteri probiotik terpilih untuk udang vannamei berdasarkan data *sequence* gen 16S *ribosomal* RNA.

No	Kode isolat	Hasil BLAST (spesies terdekat)	Homologi (%)	Bahan	Lokasi
1	P <sub>10</sub>	<i>Bacillus flexus</i> isolat LLH (DQ333292)	99	Sedimen	Pandeglang
2	P <sub>16</sub>	<i>Bacillus flexus</i> strain GS11 (DQ365587)	97	Air	Pandeglang
3	K <sub>48</sub>	<i>Bacillus flexus</i> strain GS11 (DQ365587)	95	Sedimen	Karawang
4	P <sub>43</sub>	<i>Bacillus megaterium</i> strain TK1 (EU586034)	98	Air	Pandeglang
5	P <sub>18</sub>	<i>Bacillus pumilus</i> isolat EGU275 (EF633222)	98	Usus	Pandeglang
6	S <sub>18</sub>	<i>Bacillus pumilus</i> isolat NUC-F (DQ833752)	98	Air	Serang
7	T <sub>17</sub>	<i>Bacillus pumilus</i> strain AU39 (EF032679)	95	Usus	Tangerang
8	T <sub>28</sub>	<i>Bacillus pumilus</i> strain DURCK14 (AM778191)	99	Usus	Tangerang
9	T <sub>1</sub>	<i>Bacillus pumilus</i> strain S6-05 (EU624429)	99	Air	Tangerang
10	P <sub>11</sub>	<i>Bacillus</i> sp. BSi20565 (EU330341)	98	Air	Pandeglang
11	S <sub>23</sub>	<i>Bacillus</i> sp. By231Ydz-fq (EU070372)	96	Sedimen	Serang
12	T <sub>18</sub>	<i>Bacillus</i> sp. K38T (AM983525)	99	Air	Tangerang
13	K <sub>52</sub>	<i>Bacillus</i> sp. 'Mali10' (AY211104)	97	Air	Karawang
14	P <sub>7</sub>	<i>Bacillus</i> sp. 'Mali10' (AY211104)	97	Sedimen	Pandeglang
15	T <sub>21</sub>	<i>Bacillus</i> sp. WRB-4 (EF636891)	95	Usus	Tangerang
16	T <sub>26</sub>	<i>Bacillus</i> sp. WRB-4 (EF636891)	97	Usus	Tangerang
17	T <sub>9</sub>	<i>Bacillus subtilis</i> strain S8-04 (EU620412)	96	Usus	Tangerang
18	S <sub>9</sub>	<i>Micrococcus luteus</i> clone B14 (EU196531)	99	Usus	Serang
19	T <sub>23</sub>	<i>Micrococcus</i> sp. "Mali2" (AY211096)	97	Usus	Tangerang

Keterangan: P= Pandeglang, S= Serang, T= Tangerang, K= Karawang.

Data hasil pencarian homologi *sequence* 16S *ribosomal* RNA masing-masing isolat bakteri dengan program BLAST disajikan pada Lampiran 1-19,

sedangkan data *sequence* gen 16S *ribosomal* RNA dari masing-masing isolat bakteri disajikan pada Lampiran 20.

Berdasarkan data Tabel IV.2, terdapat 2 kelompok isolat yang memiliki identitas bakteri sama yaitu *Bacillus flexus* strain GS11, untuk isolat P<sub>16</sub> dengan K<sub>48</sub>, dan *Bacillus* sp. WRB-4 untuk isolat T<sub>21</sub> dengan T<sub>26</sub>. Identitas yang sama sangat mungkin terjadi, karena isolat tersebut lolos saat uji skrining terhadap parameter kelangsungan hidup udang, seleksi berdasarkan kemampuan terapi terhadap udang yang diinfeksi WSSV, dan seleksi terhadap persentase penetasan kista *Artemia*. Pada penelitian ini, identifikasi dilakukan pada akhir penelitian terhadap isolat-isolat bakteri yang menunjukkan nilai yang lebih baik dibandingkan dengan kontrol (tanpa pemberian bakteri). Isolat P<sub>16</sub> (*Bacillus flexus*) diperoleh dari substrat 'air' di Pandeglang, sedangkan isolat K<sub>48</sub> (*Bacillus flexus*) di peroleh dari substrat 'sedimen' di Karawang. Hal tersebut mengindikasikan bahwa *Bacillus flexus* dapat hidup pada substrat air dan sedimen. Verschuere dkk. (2000) menyatakan bahwa bakteri probiotik yang digunakan untuk akuakultur terutama untuk pembenihan udang (*hatchery*) dan pemsaran udang di tambak banyak yang diisolasi dari air, sedimen, dan usus udang. Holt dkk. (1994) menyatakan bahwa bakteri dari genus *Bacillus* merupakan bakteri yang 'kosmopolit', yaitu dapat hidup dimana-mana dengan berbagai macam substrat. Kondisi tersebut sesuai dengan Isolat T<sub>21</sub> dan T<sub>26</sub> yaitu *Bacillus* sp. yang juga menunjukkan identitas yang sama. Kedua isolat tersebut diperoleh dari substrat usus udang di Tangerang.

Hasil identifikasi berdasarkan data *sequence* gen 16S *ribosomal* RNA, terdapat 8 isolat bakteri hasil BLAST hanya mencapai level genus yaitu: *Bacillus* sp. Bsi20565, *Bacillus* sp. By231Ydz-fq, *Bacillus* sp. K38T, *Bacillus* sp. Mali10 (2 isolat), *Bacillus* sp. WRB-4 (2 isolat) dan *Micrococcus* sp. Mali2. Hal tersebut karena informasi tentang bakteri tersebut yang ada pada database GenBank belum dideskripsikan hingga tingkat spesies.

Berdasarkan lokasi sampling (Tabel IV.3), terlihat bahwa *Bacillus flexus* diperoleh dari Karawang dan Pandeglang, *Bacillus megaterium* dari Pandeglang, *Bacillus pumilus* dari Serang, Tangerang dan Pandeglang, *Bacillus subtilis* dari Karawang, *Bacillus* sp., dari semua daerah, *Micrococcus luteus* dari Serang dan *Micrococcus* sp. dari Tangerang

**Tabel IV.3.** Distribusi spesies bakteri probiotik terpilih untuk udang vannamei pada lokasi sampling.

No	Spesies	Lokasi sampling			
		Serang	Tangerang	Karawang	Pandeglang
1	<i>Bacillus flexus</i>	-	-	+	+
2	<i>Bacillus megaterium</i>	-	-	-	+
3	<i>Bacillus pumilus</i>	+	+	-	+
4	<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	+	-
5	<i>Bacillus</i> spp.	+	+	+	+
6	<i>Micrococcus luteus</i>	+	-	-	-
7	<i>Micrococcus</i> sp.	-	+	-	-

Keterangan : +: ada, -: tidak ada

Data Tabel IV.3. di atas, mengindikasikan bahwa genus *Bacillus* dapat dijumpai di semua daerah sampling. Hal tersebut sejalan dengan pernyataan Holt dkk. (1994) yang menyatakan bahwa genus *Bacillus* secara umum merupakan bakteri kosmopolit (dapat hidup di banyak daerah). *Bacillus* memiliki toleransi fisiologis yang lebar terhadap panas (*heat*), derajat keasaman (pH) dan kadar garam (*salinity*), sehingga dapat ditemukan di empat daerah sampling. Pertambahan udang dari empat daerah sampling yang memiliki kemiripan karakter fisika kimia di antaranya: air dengan kadar garam 20-30 ppt, berada dekat daerah pesisir, diduga menjadi faktor pendukung diperolehnya genus *Bacillus*.

Sementara genus *Micrococcus*, meskipun memiliki toleransi kurang lebar dibanding *Bacillus*, namun *Micrococcus* dikenal sebagai bakteri *halotolerant* (Holt dkk. 1994). Bakteri tersebut mampu hidup pada lingkungan dengan kadar garam mencapai 50 ppt (Cowan 1974). Seperti telah di jelaskan sebelumnya bahwa ke-empat daerah sampling relatif memiliki karakter fisika kimia yang sama, sehingga genus *Micrococcus* juga diperoleh.

Berdasarkan bahan substrat yang diambil (Tabel IV.4), dapat dilihat bahwa *Bacillus flexus* diperoleh dari *air* dan *sedimen*, *Bacillus megaterium* diperoleh dari *air*, *Bacillus pumillus* diperoleh dari *air* dan *usus udang*, *Bacillus subtilis* diperoleh dari *usus udang*, *Bacillus spp.* diperoleh dari *air*, *sedimen* dan *usus udang*, sedangkan *Micrococcus luteus* dan *Micrococcus sp.* diperoleh dari *usus udang*.

**Tabel IV.4.** Distribusi spesies bakteri probiotik terpilih untuk udang vannamei terhadap sebaran substrat yang diperoleh.

No	Spesies	Substrat		
		Air	Sedimen	Usus udang
1	<i>Bacillus flexus</i>	+	+	-
2	<i>Bacillus megaterium</i>	+	-	-
3	<i>Bacillus pumilus</i>	+	-	+
4	<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	+
5	<i>Bacillus spp.</i>	+	+	+
6	<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	+
7	<i>Micrococcus sp.</i>	-	-	+

Keterangan: +: ada, -: tidak ada

Data Tabel IV.4., mengindikasikan bahwa secara umum bakteri dari genus *Bacillus* ditemukan pada semua substrat yang diteliti yaitu: air, sedimen dan usus udang. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Holt dkk. (1994) yang menyatakan bahwa genus *Bacillus* merupakan genus yang 'kosmopolit' karena memiliki toleransi yang lebar terhadap parameter lingkungan seperti, derajat keasaman, panas dan kadar garam (salinitas). Keunggulan tersebut yang kemudian mendorong para peneliti untuk mencoba mencari bakteri probiotik dari genus *Bacillus*, karena mudah dalam pemeliharaan dan penyimpanan untuk periode waktu lama yang merupakan salah satu kriteria dasar bakteri probiotik (Feliatra dkk. 2004).

Secara lebih spesifik Rengpipat dkk. (2000) menyatakan bahwa beberapa species dari genus *Bacillus* yang sering digunakan sebagai probiotik adalah, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*,

*Bacillus flexus* dan *Bacillus licheniformis* (tidak ditemukan dalam penelitian ini) yang diaplikasikan secara terpisah/tunggal maupun kombinasi atau dikenal dengan istilah (*Bacillus cocktail*). Aplikasi bakteri probiotik tersebut melalui penambahan langsung pada media (air) pemeliharaan, lewat pakan buatan, atau lewat pakan hidup (*live food*) sebagai *bio-encapsulation*. Bakteri-bakteri tersebut diisolasi dari beberapa substrat, di antaranya: air, sedimen, dan saluran pencernaan (Geovanny dkk. 2007).

Sementara *Micrococcus* meskipun tidak memiliki toleransi lebar seperti halnya *Bacillus*, kecuali tahan terhadap perubahan kadar garam hingga 5% (Holt dkk. 1994), namun berdasarkan hasil penelitian, bakteri tersebut diperoleh dari substrat usus udang, maka cukup potensial digunakan sebagai bakteri probiotik (Geovanny dkk. 2007) karena akan efektif meningkatkan respon imunitas dari dalam tubuh udang. Verschuere dkk. (2000) menyatakan bahwa bakteri probiotik yang hidup dan berkembang serta mendominasi dalam saluran pencernaan akan efektif menjalankan mekanisme peningkatan respon imunitas dan mekanisme lainnya seperti menghasilkan komponen penghambat berupa *bacteriocyn*, atau pun berkompetisi terhadap zat-zat tertentu, tempat dan nutrisi dari bakteri yang tidak diharapkan dari dalam tubuh udang.

Berdasarkan data Tabel IV.4, terlihat bahwa hasil identifikasi isolat-isolat bakteri terpilih terdiri dari dua genera yaitu *Bacillus* dan *Micrococcus*. Kedua genera tersebut diketahui merupakan jenis-jenis bakteri yang

digunakan untuk probiotik dalam akuakultur (Verschuere dkk. 2000; Rengpipat dkk. 2000; Balcázar dkk. 2006; Geovanny dkk. 2007).

Rengpipat dkk. (2000) melaporkan bahwa bakteri strain *Bacillus* S11 yang ditambahkan ke dalam pakan buatan udang mampu meningkatkan kelangsungan hidup udang windu (*Penaeus monodon*) sebesar 54,3% dibandingkan dengan kontrol sebesar 35,5%, setelah diuji dengan bakteri pathogen *Vibrio harveyi*. Balcázar dkk. (2007) telah melakukan penelitian menggunakan *Bacillus subtilis* UTM 126 pada udang vannamei (*Litopenaeus vannamei*) yang diuji dengan bakteri patogen *Vibrio parahaemolyticus*. Setelah 28 hari pengamatan ternyata bakteri tersebut mampu menekan rasio konversi pakan hingga 1,3 dibandingkan dengan kontrol 1,45. *Bacillus subtilis* UTM 126 juga mampu menekan populasi *Vibrio parahaemolyticus* sebesar 2 log unit dibandingkan dengan kontrol. Sementara Geovanny dkk. (2007) melaporkan bahwa bakteri strain *Micrococcus luteus* yang diisolasi dari usus ikan *Rainbow Trout* (*Oncorhynchus mykiss*) dan diberikan lewat pakan mampu meningkatkan kelangsungan hidup ikan *Rainbow Trout*.

#### **Hasil analisis filogenetik isolat bakteri terpilih**

Pohon filogenetik dibuat dengan menyejajarkan (*align*) *sequence* gen 16S *ribosomal* RNA dari jenis-jenis bakteri terdekat dengan *sequence* gen 16S *ribosomal* RNA 19 bakteri probiotik terpilih (Gambar IV.2) dan *Escherichia coli* digunakan *outgroup*. Jenis bakteri dan nomor akses dari

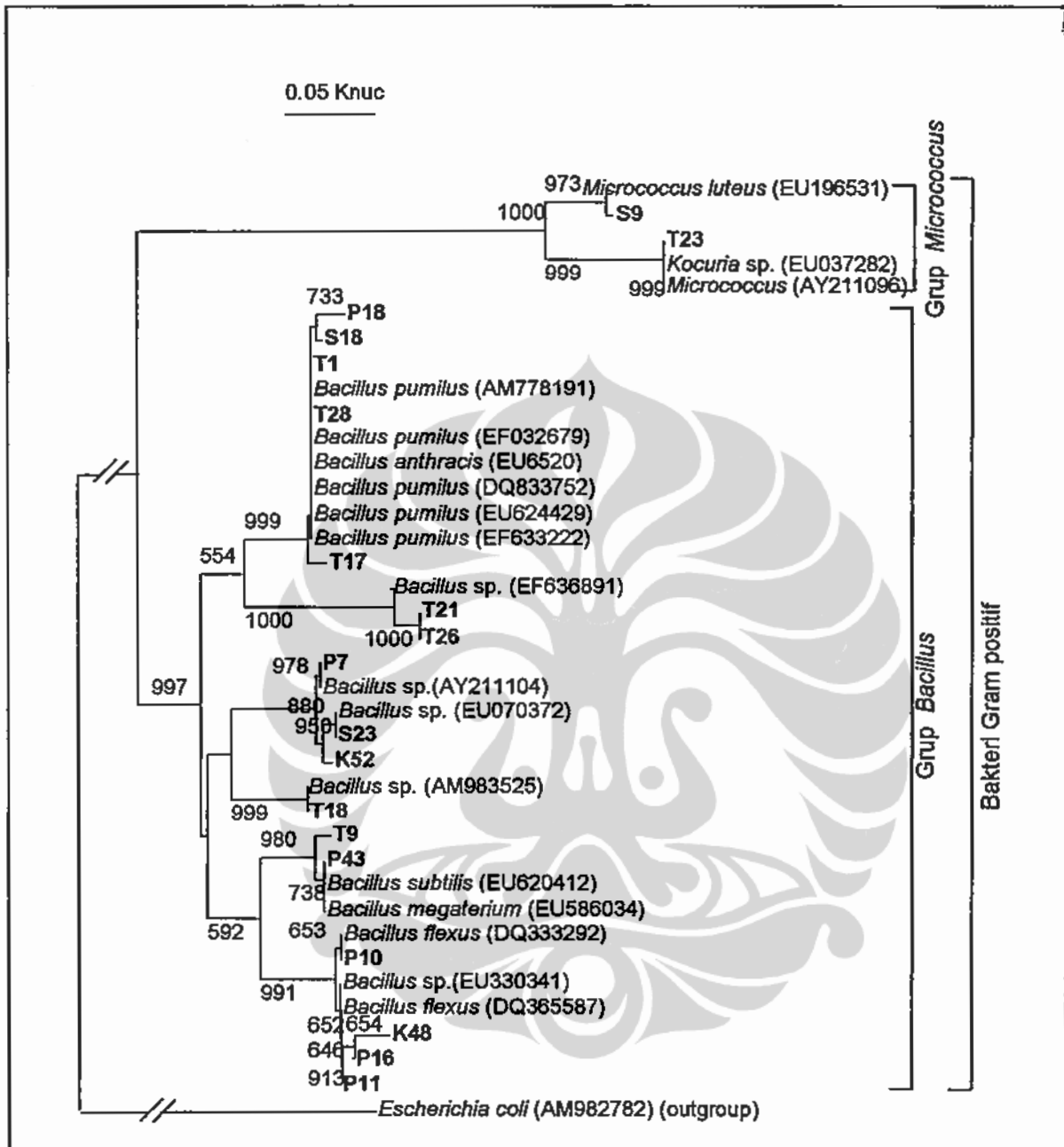


parsial gen 16S *ribosomal* RNA dari GenBank (NCBI) yang digunakan dalam pembuatan pohon filogenetik disajikan pada Tabel IV.5. sebagai berikut:

**Tabel IV.5.** Jenis bakteri dan nomor akses dari parsial gen 16S *ribosomal* RNA yang diambil dari *GenBank* yang digunakan dalam pembuatan pohon filogenetik.

No	Bakteri	Nomor akses pada GenBank
1	<i>Escherichia coli</i> strain SVUB1	(AM982782)
2	<i>Micrococcus</i> sp. Mali2	(AY211096)
3	<i>Micrococcus luteus</i> clone B14	(EU196531)
4	<i>Bacillus flexus</i> strain GS11	(DQ365587)
5	<i>Bacillus</i> sp. BSi20565	(EU330341)
6	<i>Bacillus flexus</i> LLH	(DQ333292)
7	<i>Bacillus megaterium</i>	(EU586034)
8	<i>Bacillus subtilis</i>	(EU620412)
9	<i>Bacillus</i> sp. K38T	(AM983525)
10	<i>Bacillus</i> sp. By231Ydz-fq	(EU070372)
11	<i>Bacillus</i> sp. Mali10	(AY211104)
12	<i>Bacillus</i> sp. WRB-4	(EF636891)
13	<i>Bacillus pumilus</i> EGU275	(EF633222)
14	<i>Bacillus pumilus</i> NUC-F	(DQ833752)
15	<i>Bacillus pumilus</i> AU39	(EF032679)
16	<i>Bacillus pumilus</i> S6-05	(EU624429)
17	<i>Bacillus pumilus</i>	(AM778191)
18	<i>Bacillus anthracis</i>	(EU652063)

Terdapat dua grup yaitu 17 isolat (P<sub>18</sub>, S<sub>18</sub>, T<sub>28</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>17</sub>, T<sub>21</sub>, T<sub>26</sub>, P<sub>7</sub>, S<sub>23</sub>, K<sub>52</sub>, T<sub>18</sub>, T<sub>9</sub>, P<sub>43</sub>, P<sub>10</sub>, K<sub>48</sub>, P<sub>16</sub>, P<sub>11</sub>) membentuk grup *Bacillus*, sedangkan 2 isolat yang diwakili oleh S<sub>9</sub> dan T<sub>23</sub> masuk dalam grup *Micrococcus*.



**Gambar IV.2.** Posisi filogenetik 19 isolat bakteri probiotik terpilih dalam genera *Bacillus* dan *Micrococcus* pada kelompok bakteri Gram positif berdasarkan data *sequence* parsial gen 16S rRNA. *E.coli* digunakan sebagai *outgroup*. Pohon filogenetik dibuat dengan metode *Neighbour-joining* (Saitou & Nei 1987).

Analisis pohon filogenetik (Gambar IV.2), dengan program *Clustal X*, menggunakan bakteri *Escherichia coli* sebagai *outgroup*, memperlihatkan dua kelompok besar yang terpisah antara genus *Micrococcus* (grup1) dan genus *Bacillus* (grup 2). Grup 1 (*Micrococcus*) terdiri dari Isolat S<sub>9</sub> memiliki hubungan yang erat dengan *Micrococcus luteus* clone B14 (EU196531) dengan homologi 99%, sedangkan isolat T<sub>23</sub> memiliki hubungan erat dengan *Micrococcus* Mali2 (AY211096) dan *Kocuria* sp (G3DM46(EU037282) dengan homologi 97% berdasarkan *sequence* gen 16S *ribosomal* RNA. Kedua isolat tersebut menunjukkan nilai *bootstrap*: 97,3% untuk isolat S<sub>9</sub> dan 99,9% untuk isolat T<sub>23</sub>. Perbandingan kedua nilai *bootstrap* cukup tinggi yaitu 97,3% dan 99,9% menunjukkan bahwa kedua kelompok tersebut yaitu *Micrococcus luteus* dan *Micrococcus* sp. terpisah (Meerak dkk. 2007).

Jika dilihat dari observasi makroskopik koloni isolat (Tabel IV.8), isolat bakteri *Micrococcus* sp. dan *Micrococcus luteus* memiliki kemiripan dari karakter morfologi, yaitu memiliki permukaan *mengilap*, bentuk koloni bulat, tepi koloni rata, elevasi koloni cembung. Perbedaan keduanya dapat dilihat dari warna. Isolat S<sub>9</sub> (*Micrococcus luteus*) berwarna kuning muda, sedangkan isolat T<sub>23</sub> (*Micrococcus* sp.) berwarna kuning tua.

Pada grup 2 (*Bacillus*), terdiri dari 17 isolat bakteri yang terdiri dari: P<sub>18</sub>, S<sub>18</sub>, T<sub>28</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>17</sub>, T<sub>21</sub>, T<sub>26</sub>, P<sub>7</sub>, S<sub>23</sub>, K<sub>52</sub>, T<sub>18</sub>, T<sub>9</sub>, P<sub>43</sub>, P<sub>10</sub>, K<sub>48</sub>, P<sub>16</sub>, P<sub>11</sub>. Lima isolat bakteri dengan kode P<sub>18</sub>, S<sub>18</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>28</sub> dan T<sub>17</sub> memiliki kedekatan dengan *Bacillus pumilus* DURCK14, S6-05, AU39, NUC-F dan *Bacillus anthracis* strain me-12 (EU652063) dengan nilai *bootstrap* 99,9%. Dua isolat

yaitu T<sub>21</sub> dan T<sub>26</sub> memiliki identitas sama yaitu *Bacillus* sp. WRB-4 dengan nilai *bootstrap* 100%. Satu isolat yaitu P<sub>7</sub> memiliki kedekatan dengan *Bacillus* sp Mali10 dengan nilai *bootstrap* 97,8%. Dua isolat yaitu K<sub>52</sub> dan S<sub>23</sub> memiliki kedekatan dengan *Bacillus* sp. By231Ydz-fq dengan nilai *bootstrap* 95,0%. Satu isolat memiliki kedekatan dengan *Bacillus* sp. K38T yang diwakili oleh isolat bakteri kode T<sub>18</sub> dengan nilai *bootstrap* 99,9%. Dua isolat dengan kode T<sub>9</sub> dan P<sub>43</sub> memiliki kedekatan dengan *Bacillus subtilis* S8-04 dan *Bacillus megaterium* TK1 dengan nilai *bootstrap* 98%. Satu isolat yaitu P<sub>10</sub> memiliki kedekatan dengan *Bacillus flexus* LLH dengan nilai *bootstrap* 65,3%. Isolat dengan kode K<sub>48</sub>, P<sub>16</sub> dan P<sub>11</sub>, memiliki kedekatan dengan *Bacillus flexus* strain GS11 dan *Bacillus* sp. Bsi20565 dengan nilai *bootstrap* sebesar 65,2%.

Hasil identifikasi isolat bakteri probiotik terpilih didominasi oleh genus *Bacillus*, yaitu 17 isolat (89,47%), dan sisanya dua isolat (10,53%) oleh genus *Micrococcus*. Hal tersebut cukup relevan mengingat bakteri tersebut terutama genus *Bacillus* yang merupakan bakteri Gram positif relatif dapat beradaptasi dengan lingkungan. *Bacillus* dapat dijumpai di air, tanah dan saluran pencernaan ikan (*digestive tract*) (Rengpipat dkk. 2000; Verschuere dkk. 2000; Holt dkk. 2004). *Bacillus* dapat hidup dalam kondisi *aerob* maupun *fakultatif anaerob* (Holt dkk. 2004). *Bacillus* juga mampu membentuk spora (Madigan dkk., 2000) ketika berada dalam kondisi ekstrim terhadap beberapa parameter seperti panas, pH (derajat keasaman) dan salinitas (Cowan 1974; Holt dkk. 1994). Beberapa spesies dari genus *Bacillus* adalah *B. flexus*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, dan *B. subtilis*. Secara umum keempat

bakteri tersebut memiliki beberapa karakter yang sama. Cowan (1974) mendokumentasikan beberapa karakter penting bakteri (Tabel IV.6) tersebut sebagai berikut:

Tabel IV.6. Karakter yang dimiliki genus *Bacillus* yang diperoleh.

No	Parameter	<i>B. megaterium</i>	<i>B. pumilus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. flexus</i>
1	Reaksi Gram	+	+	+	+
2	Motilitas	motil	motil	motil	motil
3	Morfologi	basil	basil	basil	basil
4	Bentuk spora	oval	oval	oval	oval
5	Posisi spora	tengah	tengah	tengah	tengah
6	Tumbuh pada 45°C	ya	ya	ya	ya
7	Tumbuh pada 65°C	tidak	tidak	tidak	tidak
8	Tumbuh pada 7% NaCl	ya	ya	ya	ya
9	Tumbuh pada pH 5.7	ya	ya	ya	ya

[Sumber: Holt dkk. 1994]

Demikian pula halnya dengan genus *Micrococcus*, hampir memiliki karakter yang sama dengan genus *Bacillus*, meskipun tidak memiliki kemampuan membentuk spora. Genus *Micrococcus* memiliki toleransi terhadap kondisi lingkungan yang kering dan lingkungan bersalinitas tinggi (bisa mencapai 7,5%) (Madigan dkk. 2000; Geovany dkk. 2007).

Kedua genera yaitu genus *Bacillus* dan genus *Micrococcus*, banyak diaplikasikan sebagai probiotik dalam akuakultur terutama pembenihan udang (*hachtery*) dan pembesaran udang di tambak (Verschuere dkk., 2000, Balcazar dkk., 2006; Rengpipat dkk., 2003), meskipun belum dilaporkan untukantisipasi penyakit WSSV pada pembesaran udang vannamei di Indonesia. Geovanny dkk. (2007) melaporkan bahwa *Micrococcus luteus* yang diisolasi dari saluran pencernaan ikan *Rainbow Trout* kemudian

diberikan melalui pakan mampu meningkatkan kelangsungan hidup ikan tersebut. Penelitian lainnya, juga dilaporkan oleh Gullian dkk. (2004) yang menyatakan bahwa bakteri *Bacillus* P64 mampu menekan populasi *Vibrio harveyi* serta meningkatkan imunitas udang.

Terdapat satu penelitian yang baru tentang aplikasi probiotik yang digunakan terhadap WSSV pada udang vannamei yang dilaporkan oleh Rodríguez dkk. (2007). Percobaan tersebut dapat dikatakan baru, namun keberhasilan tersebut merupakan kombinasi antara bakteri *Vibrio alginolyticus* dan  $\beta$ -1,3/1,6-*glucans* yang merupakan imunostimulan. Tidak dilaporkan lebih jauh, apakah keberhasilan tersebut ditunjang oleh keduanya, yaitu *Vibrio alginolyticus* dan  $\beta$ -1,3/1,6-*glucans*, atau salah satu dari keduanya. Di samping itu, bakteri *Vibrio alginolyticus* masih merupakan kontroversi (Balcázar 2006) karena masih ditemukan yang bersifat patogen terhadap ikan maupun udang.

Berdasarkan hasil analisis, ternyata keberadaan dari isolat-isolat terpilih dikaitkan dengan *taxa* dari bakteri secara umum, maka dapat dikelompokkan ke dalam kelompok bakteri gram positif (Kenneth Todar University of Wisconsin Madison 2005). Kelompok bakteri tersebut pada umumnya berbentuk batang, bulat, terkadang filamen, dengan ukuran diameter 0,3-2 $\mu$ m. Bakteri Gram positif merupakan bakteri kosmopolit (ada dimana-mana). Bakteri Gram positif juga memiliki karakter morfologi lebih baik di bandingkan dengan Gram negatif, yaitu memiliki dinding sel lebih tebal, (5-50 nm) dibandingkan dengan Gram negatif hanya 2 nm. Sel

biasanya dapat bergerak (*motile*) dan mampu membentuk spora (terutama genus *Bacillus*) jika kondisi lingkungan tidak mendukung (Holt dkk. 2004).

Keuntungan dari bakteri gram positif sebagai probiotik, terutama *Bacillus*, secara umum mampu mengkonversi bahan organik menjadi karbondioksida (CO<sub>2</sub>) lebih efisien dibandingkan dengan bakteri Gram negatif, sehingga membantu pembudidaya ikan dan udang meminimalkan bahan organik terlarut selama kegiatan budidaya (Verschuere dkk. 2000). Dampak positif dari perombakan bahan organik menjadi CO<sub>2</sub>, akan meningkatkan stabilitas fitoplankton, seiring dengan peningkatan jumlah CO<sub>2</sub> hasil perombakan bahan organik oleh *Bacillus* (Geovanny dkk. 2007). Keuntungan lainnya dari bakteri probiotik Gram positif, adalah dapat terjaga kemampuannya dan dapat bertahan untuk waktu simpan yang lama pada penyimpanan maupun di lapangan, yang merupakan salah satu kriteria dasar bakteri probiotik (Verschuere dkk. 2000; Feliatra dkk. 2004). Hal tersebut karena *Bacillus* dan *Micrococcus* memiliki toleransi cukup baik terhadap beberapa parameter lingkungan, seperti derajat keasaman (pH), panas (*heat*) dan kadar garam (salinitas) (Holt dkk. 1994), bahkan *Bacillus* mampu membentuk spora yang sangat baik untuk bakteri probiotik, karena dapat dilakukan penyimpanan dalam fase *dormant* (Verschuere dkk. 2000).

Bakteri Gram negatif tidak ditemukan pada isolat terpilih yang diidentifikasi berdasarkan *sequence* gen 16S *ribosomal* RNA. Hal tersebut diduga karena, bakteri Gram negatif yang mungkin diperoleh saat isolasi awal, tidak menunjukkan karakter bakteri probiotik, yaitu meningkatkan respon

imunitas udang. Bakteri Gram negatif yang mungkin didapat tidak menunjukkan mekanisme meningkatkan respon imunitas udang vannamei, sehingga tidak lolos pada tahap seleksi berdasarkan kemampuan terapi terhadap WSSV. Verschueren dkk. (2000) menyatakan bahwa, salah satu bakteri Gram negatif yang digunakan sebagai probiotik pada udang adalah *Vibrio alginolyticus*. Bakteri tersebut ditambahkan pada media pemeliharaan udang untuk menekan bakteri patogen seperti *Vibrio harveyi* yang dapat menimbulkan penyakit udang menyalu (*luminescent disease*). Bakteri *Vibrio alginolyticus* dapat menghasilkan komponen penghambat (*bacteriocins*) terhadap *Vibrio harveyi* (Rengpipat dkk. 2000; Verschueren 2000).

Meskipun kedua genus yang diperoleh dari penelitian ini, yaitu *Bacillus* dan *Micrococcus* menunjukkan mekanisme probiotik untuk udang terhadap WSSV, namun harus memenuhi persyaratan beberapa karakteristik penting bakteri probiotik yang akan diaplikasikan. Feliatra dkk. (2004) menyatakan beberapa karakteristik tersebut sebagai berikut: (1) tidak bersifat patogen atau mengganggu inang; (2) tidak bersifat patogen untuk konsumen; (3) tidak mengganggu keseimbangan ekosistem setempat; (4) mikroorganisme tersebut hendaklah dapat dan mudah dipelihara dan diperbanyak; (5) dapat hidup dan bertahan serta berkembang biak di dalam usus inangnya; (6) mampu hidup pada kisaran pH yang lebar; (7) dapat dipelihara dalam media yang memungkinkan untuk diintroduksi ke dalam usus inangnya; (8) dapat hidup dan berkembang di dalam wadah pemeliharaan ikan; (9) dapat disiapkan sebagai produk sel hidup pada skala industri; (10) dapat terjaga



stabilitas dan sintasannya untuk waktu yang lama pada penyimpanan maupun di lapangan (Verschuere dkk. 2000; Feliatra dkk. 2004).

Berdasarkan beberapa persyaratan tersebut di atas, maka secara umum, semua isolat terpilih memenuhi hampir semua kriteria yang disyaratkan sebagai bakteri probiotik. Seperti telah didiskusikan di atas, bahwa grup *Bacillus* merupakan bakteri yang memiliki toleransi yang baik terhadap beberapa parameter lingkungan seperti, derajat keasaman, panas dan kadar garam sehingga mampu hidup di hampir semua tempat (kosmopolit) (Holt dkk 1994). Bahkan *Bacillus* dapat membentuk spora jika berada pada kondisi lingkungan yang ekstrim yang sangat baik untuk penyimpanan dalam periode waktu yang lama. Demikian juga dengan *Micrococcus*, meskipun tidak memiliki kemampuan membentuk spora, namun memiliki toleransi yang baik terhadap kadar garam (*halotolerant*) (Holt dkk. 1994; Verschuere dkk. 2000). Tiga karakter yang perlu pengkajian lebih dalam yaitu: tidak bersifat patogen untuk konsumen, dapat disiapkan sebagai produk sel hidup pada skala industri dan dapat terjaga stabilitas kemampuannya untuk waktu yang lama pada penyimpanan maupun di lapangan. Rangkaian percobaan lanjutan dibutuhkan untuk menguji ketiga persyaratan tersebut.

Berdasarkan spesies yang diperoleh, baru 2 bakteri yang dinyatakan masuk kategori *generally recognize as safe* (GRAS), yaitu *Bacillus subtilis* (Sorokulova, dkk. 2007) dan *Bacillus pumilus* (Duc dkk. 2004). *Bacillus subtilis* dan *Bacillus pumilus* saat ini dinyatakan aman untuk manusia, melalui

serangkaian penelitian yang dilakukan oleh *European Food Safety Authority* (EFSA). Kedua bakteri tersebut sensitif terhadap semua antibiotik yang terdaftar di EFSA, dan lolos beberapa uji toksisitas dan uji oral. Uji oral (*oral LD<sub>50</sub>*) dilakukan pada dosis lebih dari  $10^{11}$  CFU/ml.

### **Pengamatan morfologi isolat bakteri**

Hasil observasi makroskopik terhadap 19 isolat bakteri terpilih (Tabel IV.8) berdasarkan *morphotype*: bentuk koloni, tepi koloni dan elevasi koloni terlihat bahwa terdapat 5 kelompok warna isolat yaitu: 1) warna putih 5 isolat terdiri dari S<sub>18</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>17</sub>, T<sub>28</sub>, P<sub>18</sub>, 2) warna *orange* muda 2 isolat terdiri dari T<sub>9</sub>, P<sub>43</sub>, 3) warna *pink orange* 6 isolat terdiri dari T<sub>21</sub>, T<sub>26</sub>, K<sub>48</sub>, P<sub>10</sub>, P<sub>16</sub>, P<sub>11</sub>, 4) warna kuning/kuning muda 2 isolat terdiri dari S<sub>9</sub>, T<sub>23</sub> dan 5) warna merah muda 4 isolat terdiri dari S<sub>23</sub>, T<sub>18</sub>, K<sub>52</sub>, P<sub>7</sub>. Semua isolat bakteri memiliki permukaan yang *mengilap* tepi koloni rata, dan elevasi koloni *cembung*. Sementara dari bentuk koloni, semuanya berbentuk bulat kecuali 4 isolat yaitu: K<sub>48</sub>, P<sub>10</sub>, P<sub>11</sub> dan P<sub>16</sub> yang berbentuk bulat cenderung tidak beraturan. Observasi tersebut dilakukan terhadap koloni bakteri yang telah diinkubasikan 48 jam (30° C).

**Tabel IV.7.** Hasil pengamatan morfologi makroskopik isolat bakteri probiotik terpilih yang diinkubasi 48 jam pada suhu 30° C

No	Kode isolat	Bahan	Morfologi makroskopik koloni				
			Warna	Permukaan	Bentuk	Tepi	Elevasi
1	S <sub>16</sub>	Air	Putih	Mengilap	Bulat	Rata	Cembung
2	T <sub>1</sub>	Air	Putih	Mengilap	Bulat	Rata	Cembung
3	T <sub>17</sub>	Usus	Putih	Mengilap	Bulat	Rata	Cembung
4	T <sub>28</sub>	Usus	Putih	Mengilap	Bulat	Rata	Cembung
5	P <sub>18</sub>	Usus	Putih	Mengilap	Bulat	Rata	Cembung
6	T <sub>9</sub>	Usus	Orange muda	Mengilap	Bulat	Rata	Cembung
7	P <sub>43</sub>	Air	Orange muda	Mengilap	Bulat	Rata	Cembung
8	T <sub>21</sub>	Usus	<i>Pink Orange</i>	Mengilap	Bulat	Rata	Cembung
9	T <sub>26</sub>	Usus	<i>Pink Orange</i>	Mengilap	Bulat	Rata	Cembung
10	K <sub>48</sub>	Sedimen	<i>Pink Orange</i>	Mengilap	Bulat cenderung tidak beraturan	Rata	Cembung
11	P <sub>10</sub>	Sedimen	<i>Pink Orange</i>	Mengilap	Bulat cenderung tidak beraturan	Rata	Cembung
12	P <sub>16</sub>	Air	<i>Pink Orange</i>	Mengilap	Bulat cenderung tidak beraturan	Rata	Cembung
13	P <sub>11</sub>	Air	<i>Pink Orange</i>	Mengilap	Bulat cenderung tidak beraturan	Rata	Cembung
14	S <sub>6</sub>	Usus	Kuning muda	Mengilap	Bulat	Rata	Cembung
15	T <sub>23</sub>	Usus	Kuning	Mengilap	Bulat	Rata	Cembung
16	S <sub>23</sub>	Sedimen	Merah muda	Mengilap	Bulat	Rata	Cembung
17	T <sub>18</sub>	Air	Merah muda	Mengilap	Bulat	Rata	Cembung
18	K <sub>52</sub>	Air	Merah muda	Mengilap	Bulat	Rata	Cembung
19	P <sub>7</sub>	Sedimen	Merah muda	Mengilap	Bulat	Rata	Cembung

Keterangan: P= Pandeglang, K= Karawang, S= Serang, T= Tangerang.

Secara umum, makroskopik karakter dari morfologi isolat bakteri yang diperoleh merupakan karakter *morphotype* probiotik yang digunakan dalam pembudidayaan udang (Irianto 2003; Verschuere dkk. 2000). Verschuere dkk. (2000) menyatakan bahwa morfologi koloni bakteri probiotik dalam budidaya udang yang sering dijumpai adalah warna koloni putih, *cream*, *orange*, kuning hingga merah, dengan bentuk koloni bulat pada media Agar.

Gatesoupe (1999) menyatakan bahwa warna koloni bakteri putih hingga merah banyak dijumpai pada *Bacillus* sp. sedangkan warna koloni kuning sering dijumpai pada *Vibrio* sp., yaitu *Vibrio alginolyticus* dan *Micrococcus luteus*. Namun demikian pengamatan berdasarkan *morphotype* koloni bakteri berdasarkan informasi fenotipik memiliki kelemahan dalam hal akurasi. Salah satu kelemahan metode berdasarkan *morphotype* antara lain: morfologi sel bakteri terlalu simpel, yaitu bulat, batang dan spiral, dan spesies yang sama bisa memiliki variasi morfologi berbeda (Cowan 1974; Nilsson & Strom 2002). Metode berbasis informasi genotifik, yaitu metode berdasarkan data *sequence* gen 16S *ribosomal* RNA yang digunakan dalam penelitian ini, dapat menutupi kelemahan metode berbasis informasi fenotipik (Madigan dkk. 2000).

Berdasarkan hasil penelitian ini yaitu diperolehnya 19 isolat bakteri lokal, merupakan suatu terobosan yang bermanfaat untuk pengembangan budidaya udang vannamei. Hal tersebut karena bakteri dari dua genus terpilih yaitu: *Bacillus* dan *Micrococcus* dapat digunakan sebagai agen terapi pada udang vannamei terhadap serangan WSSV dan tidak berdampak negatif terhadap persentase penetasan kista *Artemia* serta mampu menekan bakteri *Vibrio* dalam media penetasan kista *Artemia*.

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil identifikasi data *sequence* gen 16S *ribosomal* RNA, menunjukkan bahwa isolat terpilih berasal dari dua genera bakteri Gram

positif yang terdiri dari 2 genus dan 7 spesies. Genus *Bacillus* terdiri dari *Bacillus* sp., *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. flexus* sedangkan genus *Micrococcus* terdiri dari *Micrococcus* sp. dan *Micrococcus luteus*.

#### DAFTAR ACUAN

- Angert, E.R., D.E. Northup, A.L.Reysenbach, A.S.Peek, B. M. Goebel, & N. R. Pace. 1998. Molecular phylogenetic analysis of a bacterial community in Sulphur River, Parker Cave, Kentucky. *American Mineralogist*. **83**:1583-1592.
- Balcázar, J.L., I.de Blas, I.R.Zarzuela, D. Cunningham, D. Vendrell & J.L. Múszquiz. 2006. The role of probiotic in aquaculture. *Veterinary Microbiology*. **114**:173-186.
- Balcázar, J.L., T. Rojas-luna & D. P. Cunningham. 2007. Effect of addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Invertebrate Pathology*. **96**:147-150.
- Brown, T.A. 1999. *Genomes*. Bios scientific publisher. 472 hlm.
- Cowan, S. T. 1974. *Manual for the identification of medical bacteria*. Cambridge University Press. London Second edition. 229 hlm.
- Duc Le H., H. A. Hong, T. M. Barbosa, A. O. Henriques, & Simon M. Cutting. 2004. Characterization of *Bacillus* Probiotics Available for Human Use. *Appl. Environm Microbiol*. **70**(4):2161-2171.
- Feliatra, I. Efendi & E. Suryadi. 2004. Isolasi dan indentifikasi bakteri probiotik dari ikan kerapu macan (*Ephinephelus fuscogutattus*) dalam upaya efisiensi pakan ikan. *Natur Indonesia*. **6**(2):75-80(2004).
- Gatesoupe, F.J. 1997. Siderophore production and probiotic effect of *Vibrio* sp. associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. *Aquat. Living. Resour*. **10**:239-246.
- Gatesoupe, F.J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. A review. *Aquaculture*. **180**:147-165.

- Geovany, G.R., B. J.Luis & M.A Shen. 2007. Probiotics as control agents in aquaculture. A review. *Journal of Ocean University of China*. 6(1):76-79.
- Gullian, M., F. Thompson & J. Rodriguez. 2004. Selection of Probiotic Bacteria and Study of their Immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. 233:1-14.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley & S.T. William. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams and Wilkins, Ninth edition. Baltimore, Maryland, USA. 754 hlm.
- Holmes. S. 2003. Bootstrapping phylogenetic trees: theory and methods. *Statistical Science*. 18:241-255.
- Irianto, A. 2003. *Probiotik akuakultur*. Gadjah Mada University Press. 125 hlm.
- Kenneth Todar University of Wisconsin Madison. 2005. Procaryotes in the environment. <http://www.textbookofbacteriology.net/environment.html>. Departement of Bacteriology. 29 Juli 2008, pk. 22.05 WIB.
- Lightner, D.V. (Ed) (1996). *A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA. 315 hlm.
- Li, W.H. & D. Graur. 1991. *Fundamentals of molecular evolution*. Sinaer Associates, INC. Sunderland, Massachusetts. USA. 268 hlm.
- Macrae, A. 2000. The use of 16S rDNA Methods in Soil Microbial Ecology. *Brazilian Journal of Microbiology*. 31:77-82.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko & J. Parker. 2000. *Brock, biology microorganisms*. Ninth edition. Prentice Hall International, Inc. Southern Illinois University Carbondale. 991 hlm.
- Meerak, J. H. Lida, Y. Watanabe, M. Miyashita, H. Sato, Y. Nakagawa, & Y. Tahara. Phylogeny of  $\gamma$ -polyglutamic acid-producing *Bacillus* strains isolated from fermented soybean foods manufactured in Asian countries. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 53:315-323.
- Nilsson, W. B., & M. S. Strom. 2002. Detection and identification of bacterial pathogens of fish in kidney tissue using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes. *Dis Aquat Org.* 48:175-185.

- Okamoto, T., K. Fujioka & T. Naganuma. 2001. Phylogenetic similarity of aerobic gram-negative halophilic bacteria from a deep-sea hydrothermal mound and Antarctic habitats. *Polar Biosci.* **14**:1-9.
- Rengpipat, S., W. Phianphak, S. Piyatiratitivorakul, & P. Menasveta. 1998. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture.* **167**:301-313.
- Rengpipat, S., S. Rukpratanporn., S. Piyatiratitivorakul & P. Menasaveta. 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture.* **191**:271-288.
- Rengpipat, S., A. Tunyanun., A.W.Fast., S.Piyatiratitivorakul., & P. Menasveta. 2003. Enhanced growth and resistance to *Vibrio* challenge in pond-reared black tiger shrimp *Penaeus monodon* fed a *Bacillus* probiotic. *Dis Aquat Org.* **55**:169-173.
- Saitou, N & M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406-425.
- Sjamsuridzal, W & A. Oetari. 2003. Rapid preparation of fungal and bacterial genomic DNA for PCR. *Hayati.* **10**(3):122-124.
- Sorokulova, I.B., I.V. Pinchuck, M. Denayrolles, I.G. Osipova, J.M. Huang, S.M. Cutting & M.C. Urdaci. 2007. The safety of two *Bacillus* probiotic strains for human use [Abstract]. *Digestive Diseases and Science.* **53**(4):954-963.
- Tirola, M., E. T. Valtonen, P. R. Kinnunen & M. S. Kulomaa. 2002. diagnosis of flavobacteriosis by direct amplification of rRNA genes. *Dis Aquat Org.* **51**:93-100.
- Verschuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos & W. Verstraete. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* **64**(4):655-671.
- Yuwono, T. 2006. *Teori dan aplikasi polymerase chain reaction.* ANDI. Yogyakarta. 239 hlm.





Lampiran IV.1. Hasil BLAST data sequence gen 16S rRNA, isolat P10.

Accession	Description	Max Score	Ident	Query	Hit	Max Ident
<u>D0416791.1</u>	Bacillus sp. G1DM-53 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	<u>704</u>	704	97%	0.0	98%
<u>D0333292.1</u>	Bacillus flexus isolate LLH 16S ribosomal RNA gene, partial	<u>704</u>	704	97%	0.0	98%
<u>AJ550461.1</u>	Bacillus flexus partial 16S rRNA gene	<u>704</u>	704	97%	0.0	98%
<u>AF217809.1</u>	Bacillus sp. KY963 16S ribosomal RNA gene, partial seque	<u>701</u>	701	97%	0.0	98%
<u>AM992190.1</u>	Bacillus flexus partial 16S rRNA gene, isolate TS IW 14	<u>699</u>	699	94%	0.0	98%
<u>EU070377.1</u>	Bacillus sp. By104(A)Ydz-dh 16S ribosomal RNA gene, part	<u>699</u>	699	94%	0.0	98%
<u>EU588725.1</u>	Bacillus flexus strain B1204 16S ribosomal RNA gene, parti.	<u>699</u>	699	94%	0.0	98%
<u>EU330341.1</u>	Bacillus sp. BS120565 16S ribosomal RNA gene, partial seq	<u>699</u>	699	97%	0.0	98%
<u>EU283319.1</u>	Bacillus flexus strain N108 554 16S ribosomal RNA gene, p	<u>699</u>	699	97%	0.0	98%
<u>AM778192.1</u>	Bacillus flexus partial 16S rRNA gene, strain DURCK15	<u>699</u>	699	97%	0.0	98%
<u>EF522790.1</u>	Bacillus sp. 093903 16S ribosomal RNA gene, partial seque	<u>699</u>	699	94%	0.0	98%
<u>EF157300.1</u>	Bacillus flexus strain XJU-3 16S ribosomal RNA gene, parti	<u>699</u>	699	94%	0.0	98%
<u>D0365587.1</u>	Bacillus flexus strain GS11 16S ribosomal RNA gene, parti	<u>699</u>	699	97%	0.0	98%
<u>D0339687.1</u>	Bacillus flexus isolate BRL02-65 16S ribosomal RNA gene, I	<u>699</u>	699	97%	0.0	98%
<u>AJ784845.1</u>	Bacillus sp. Con a/4 partial 16S rRNA gene, isolate Con a/4	<u>699</u>	699	97%	0.0	98%
<u>AJ563600.1</u>	Bacillus flexus partial 16S rRNA gene, strain B14	<u>699</u>	699	97%	0.0	98%
<u>D0270752.1</u>	Bacillus sp. B-2036 16S ribosomal RNA gene, partial seque	<u>699</u>	699	97%	0.0	98%
<u>AB021185.1</u>	Bacillus flexus gene for 16S ribosomal RNA	<u>699</u>	699	97%	0.0	98%
<u>EU685811.1</u>	Bacillus sp. Q12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>697</u>	697	92%	0.0	99%
<u>EU070386.1</u>	Bacillus sp. By119(B)Ydz-dh 16S ribosomal RNA gene, part	<u>697</u>	697	94%	0.0	96%

Lampiran IV.2. Hasil BLAST data sequence gen 16S rRNA, isolat P16.

Accession	Query	Hit	Score	Identity	Positives	Accession	Query	Hit	Score	Identity	Positives
<u>EU330341.1</u>	Bacillus sp. BSi20565 16S ribosomal RNA gene, partial seq	<u>721</u>	721	98%	0.0	97%					
<u>DQ365587.1</u>	Bacillus flexus strain GS11 16S ribosomal RNA gene, partial	<u>721</u>	721	98%	0.0	97%					
<u>AJ784845.1</u>	Bacillus sp. Con a/4 partial 16S rRNA gene, isolate Con a/4	<u>721</u>	721	98%	0.0	97%					
<u>AJ563600.1</u>	Bacillus flexus partial 16S rRNA gene, strain B14	<u>721</u>	721	98%	0.0	97%					
<u>DQ270752.1</u>	Bacillus sp. B-2036 16S ribosomal RNA gene, partial seque	<u>721</u>	721	98%	0.0	97%					
<u>AB021185.1</u>	Bacillus flexus gene for 16S ribosomal RNA	<u>721</u>	721	98%	0.0	97%					
<u>DQ339687.1</u>	Bacillus flexus isolate BRJ02-65 16S ribosomal RNA gene, p	<u>717</u>	717	98%	0.0	97%					
<u>AF217809.1</u>	Bacillus sp. KY1963 16S ribosomal RNA gene, partial seque	<u>717</u>	717	98%	0.0	97%					
<u>DQ416791.1</u>	Bacillus sp. G1DM-53 16S ribosomal RNA gene, partial seq	<u>715</u>	715	98%	0.0	97%					
<u>AM778192.1</u>	Bacillus flexus partial 16S rRNA gene, strain DURCK15	<u>715</u>	715	98%	0.0	97%					
<u>DQ333292.1</u>	Bacillus flexus isolate LLH 16S ribosomal RNA gene, partial	<u>715</u>	715	98%	0.0	97%					
<u>DQ514312.1</u>	Bacillus flexus strain P27-25 16S ribosomal RNA gene, part	<u>715</u>	715	98%	0.0	97%					
<u>AJ550461.1</u>	Bacillus flexus partial 16S rRNA gene	<u>715</u>	715	98%	0.0	97%					
<u>EU588725.1</u>	Bacillus flexus strain BI204 16S ribosomal RNA gene, parti.	<u>710</u>	710	98%	0.0	96%					
<u>FU283319.1</u>	Bacillus flexus strain NIOB 554 16S ribosomal RNA gene, p	<u>710</u>	710	97%	0.0	97%					
<u>AM992190.1</u>	Bacillus flexus partial 16S rRNA gene, isolate TS IW 14	<u>708</u>	708	98%	0.0	96%					
<u>EU257221.1</u>	Bacillus sp. BY104(B)Ydz-dh 16S ribosomal RNA gene, part	<u>708</u>	708	98%	0.0	96%					
<u>EF633209.1</u>	Bacillus sp. EGU75 16S ribosomal RNA gene, partial seque	<u>708</u>	708	97%	0.0	97%					
<u>AY647285.1</u>	Bacillus flexus strain MSU1610 16S ribosomal RNA gene, p	<u>704</u>	704	98%	0.0	96%					
<u>AY422986.1</u>	Bacillus flexus 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>704</u>	704	97%	0.0	96%					

Lampiran IV.3. Hasil BLAST data sequence gen 16S rRNA, isolat K48.

Accession	Query	Match	Score	Identical	Positives	Matrix	Gap	Open	Penalty	Filter
<u><a href="#">EU330341.1</a></u>	Bacillus sp. BSi20565 16S ribosomal RNA gene, partial seq	<u><a href="#">721</a></u>		721	98%		0.0			97%
<u><a href="#">DQ365587.1</a></u>	Bacillus flexus strain GS11 16S ribosomal RNA gene, partial	<u><a href="#">721</a></u>		721	98%		0.0			97%
<u><a href="#">AJ784845.1</a></u>	Bacillus sp. Con a/4 partial 16S rRNA gene, isolate Con a/4	<u><a href="#">721</a></u>		721	98%		0.0			97%
<u><a href="#">AJ563600.1</a></u>	Bacillus flexus partial 16S rRNA gene, strain B14	<u><a href="#">721</a></u>		721	98%		0.0			97%
<u><a href="#">DQ270752.1</a></u>	Bacillus sp. B-2036 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u><a href="#">721</a></u>		721	98%		0.0			97%
<u><a href="#">AB021185.1</a></u>	Bacillus flexus gene for 16S ribosomal RNA	<u><a href="#">721</a></u>		721	98%		0.0			97%
<u><a href="#">DQ339687.1</a></u>	Bacillus flexus isolate BRL02-65 16S ribosomal RNA gene, I	<u><a href="#">717</a></u>		717	98%		0.0			97%
<u><a href="#">AF217809.1</a></u>	Bacillus sp. KY963 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u><a href="#">717</a></u>		717	98%		0.0			97%
<u><a href="#">DQ416791.1</a></u>	Bacillus sp. G1DM-53 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u><a href="#">715</a></u>		715	98%		0.0			97%
<u><a href="#">AM778192.1</a></u>	Bacillus flexus partial 16S rRNA gene, strain DURCK15	<u><a href="#">715</a></u>		715	98%		0.0			97%
<u><a href="#">DQ333292.1</a></u>	Bacillus flexus isolate LLH 16S ribosomal RNA gene, partial	<u><a href="#">715</a></u>		715	98%		0.0			97%
<u><a href="#">DQ514312.1</a></u>	Bacillus flexus strain P27-25 16S ribosomal RNA gene, partial	<u><a href="#">715</a></u>		715	98%		0.0			97%
<u><a href="#">AJ550461.1</a></u>	Bacillus flexus partial 16S rRNA gene	<u><a href="#">715</a></u>		715	98%		0.0			97%
<u><a href="#">EU588725.1</a></u>	Bacillus flexus strain BI204 16S ribosomal RNA gene, partial	<u><a href="#">710</a></u>		710	98%		0.0			96%
<u><a href="#">FJ1283319.1</a></u>	Bacillus flexus strain NIOB 554 16S ribosomal RNA gene, p	<u><a href="#">710</a></u>		710	97%		n.n			97%
<u><a href="#">AM992190.1</a></u>	Bacillus flexus partial 16S rRNA gene, isolate TS IW 14	<u><a href="#">708</a></u>		708	98%		0.0			96%
<u><a href="#">EU257221.1</a></u>	Bacillus sp. BY104(B)Ydz-dh 16S ribosomal RNA gene, partial	<u><a href="#">708</a></u>		708	98%		0.0			96%
<u><a href="#">EF633209.1</a></u>	Bacillus sp. EGU75 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u><a href="#">708</a></u>		708	97%		0.0			97%
<u><a href="#">AY647285.1</a></u>	Bacillus flexus strain MSU1610 16S ribosomal RNA gene, p	<u><a href="#">704</a></u>		704	98%		0.0			96%
<u><a href="#">AY422986.1</a></u>	Bacillus flexus 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u><a href="#">704</a></u>		704	97%		0.0			96%

Lampiran IV.4. Hasil BLAST data sequence gen 16S rRNA, isolat P43.

Accession	Description	Max Score	Total Score	Query Coverage	E-value	Max Identity
<u>EF405625.1</u>	Bacillus sp. CCBAU 13245 16S ribosomal RNA gene, partial	<u>414</u>	414	61%	1e-112	93%
<u>EU586034.1</u>	Bacillus megaterium strain TK1 16S ribosomal RNA gene, full	<u>405</u>	405	50%	8e-110	98%
<u>EU723827.1</u>	Bacillus megaterium strain HDDMM05 16S ribosomal RNA gene, full	<u>401</u>	401	50%	1e-108	98%
<u>EU723823.1</u>	Bacillus subtilis strain HDDMM01 16S ribosomal RNA gene, full	<u>401</u>	401	50%	1e-108	98%
<u>EU723818.1</u>	Bacillus megaterium strain HDDMG02 16S ribosomal RNA gene, full	<u>401</u>	401	50%	1e-108	98%
<u>FM164631.1</u>	Bacillus megaterium 16S rRNA gene, isolate TS IW 36	<u>401</u>	401	50%	1e-108	98%
<u>FM164630.1</u>	Bacillus megaterium partial 16S rRNA gene, isolate TS IW 36	<u>401</u>	401	50%	1e-108	98%
<u>EU702754.1</u>	Bacillus megaterium strain COLL/A6 16S ribosomal RNA gene, full	<u>401</u>	401	50%	1e-108	98%
<u>EU704698.1</u>	Bacillus megaterium strain JC3 16S ribosomal RNA gene, partial	<u>401</u>	401	50%	1e-108	98%
<u>EU624435.1</u>	Bacillus subtilis strain S6-11 16S ribosomal RNA gene, partial	<u>401</u>	401	50%	1e-108	98%
<u>EU661811.1</u>	Bacillus sp. B-32 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>401</u>	401	50%	1e-108	98%
<u>EU661792.1</u>	Bacillus sp. C-24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>401</u>	401	50%	1e-108	98%
<u>EU661789.1</u>	Bacillus sp. C-18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>401</u>	401	50%	1e-108	98%
<u>AM992195.1</u>	Bacillus megaterium partial 16S rRNA gene, isolate TS IW 36	<u>401</u>	401	50%	1e-108	98%
<u>AM992177.1</u>	Bacillus megaterium partial 16S rRNA gene, isolate PC IW 36	<u>401</u>	401	50%	1e-108	98%
<u>EU652860.1</u>	Bacillus sp. ZY040 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>401</u>	401	50%	1e-108	98%
<u>EU652859.1</u>	Bacillus sp. ZY036 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>401</u>	401	50%	1e-108	98%
<u>EU652856.1</u>	Bacillus sp. ZY017 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>401</u>	401	50%	1e-108	98%
<u>EU627686.1</u>	Bacillus megaterium strain LB07 16S ribosomal RNA gene, full	<u>401</u>	401	50%	1e-108	98%
<u>EU620412.1</u>	Bacillus subtilis strain S8-04 16S ribosomal RNA gene, partial	<u>401</u>	401	50%	1e-108	98%

Lampiran IV.5. Hasil BLAST data sequence gen 16S rRNA, isolat P18

Query	Database	Match	Total Score	Identical	E-Value	Max. Identical
<u>DQ904611.1</u>	Bacillus pumilus strain 7281 16S ribosomal RNA gene, parti	<u>392</u>	392	91%	3e-106	97%
<u>EU430990.1</u>	Bacillus pumilus isolate 18 16S ribosomal RNA gene, partia	<u>390</u>	390	89%	1e-105	98%
<u>EF633222.1</u>	Bacillus pumilus isolate EGU275 16S ribosomal RNA gene, I	<u>390</u>	390	90%	1e-105	98%
<u>EU660365.1</u>	Bacillus pumilus strain CT13 16S ribosomal RNA gene, part	<u>388</u>	388	88%	4e-105	98%
<u>EU624429.1</u>	Bacillus pumilus strain S6-05 16S ribosomal RNA gene, par	<u>388</u>	388	88%	4e-105	98%
<u>EU537588.1</u>	Uncultured bacterium clone nbt74e09 16S ribosomal RNA g	<u>388</u>	388	88%	4e-105	98%
<u>EU661798.1</u>	Bacillus sp. A-28 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	<u>388</u>	388	88%	4e-105	98%
<u>EU661797.1</u>	Bacillus sp. C-33 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	<u>388</u>	388	88%	4e-105	98%
<u>EU661788.1</u>	Bacillus sp. C-3(2008) 16S ribosomal RNA gene, partial sec	<u>388</u>	388	88%	4e-105	98%
<u>EU652879.1</u>	Bacillus sp. ZY011 16S ribosomal RNA gene, partial sequer	<u>388</u>	388	88%	4e-105	98%
<u>EU418725.1</u>	Bacillus pumilus strain GM35 16S ribosomal RNA gene, par	<u>388</u>	388	88%	4e-105	98%
<u>EU070406.1</u>	Bacillus sp. By253Ydz-fq 16S ribosomal RNA gene, partial :	<u>388</u>	388	88%	4e-105	98%
<u>EU070389.1</u>	Bacillus sp. By140Ydz-ss 16S ribosomal RNA gene, partial :	<u>388</u>	388	88%	4e-105	98%
<u>EU070368.1</u>	Bacillus sp. B351(C)Ydz-ji 16S ribosomal RNA gene, partia	<u>388</u>	388	88%	4e-105	98%
<u>EU652063.1</u>	Bacillus anthracis strain me-12 16S ribosomal RNA gene, p	<u>388</u>	388	88%	4e-105	98%
<u>EU596537.1</u>	Bacillus pumilus strain HN005 16S ribosomal RNA gene, pa	<u>388</u>	388	88%	4e-105	98%
<u>EU589284.1</u>	Uncultured soil bacterium clone 2_B3 16S ribosomal RNA g	<u>388</u>	388	88%	4e-105	98%
<u>EU558973.1</u>	Bacillus sp. cp-h23 16S ribosomal RNA gene, partial sequel	<u>388</u>	388	88%	4e-105	98%
<u>EU253499.1</u>	Bacillus pumilus isolate ASW6 16S ribosomal RNA gene, pa	<u>388</u>	388	88%	4e-105	98%
<u>EU253498.1</u>	Bacillus pumilus isolate ASW5 16S ribosomal RNA gene, pa	<u>388</u>	388	88%	4e-105	98%

Lampiran IV.6. Hasil BLAST data sequence gen 16S rRNA, isolat S18.

Accession	Description	Max Score	Ident Score	Identy (%)	E- value	Map Ident
<u>AM778191.1</u>	Bacillus pumilus partial 16S rRNA gene, strain DURCK14	<u>472</u>	472	59%	8e-130	97%
<u>EU026426.1</u>	Uncultured Bacillus sp. clone 1 16S ribosomal RNA gene, p	<u>470</u>	470	55%	3e-129	98%
<u>EU746414.1</u>	Bacillus sp. C-32 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	<u>462</u>	462	55%	5e-127	98%
<u>EU661810.1</u>	Bacillus sp. B-26 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	<u>462</u>	462	55%	5e-127	98%
<u>DQ833752.1</u>	Bacillus pumilus isolate NUC-F 16 ribosomal RNA gene, par	<u>462</u>	462	55%	5e-127	98%
<u>DQ978251.1</u>	Bacillus pumilus isolate TD26 16S ribosomal RNA gene, par	<u>462</u>	462	58%	5e-127	97%
<u>EU660365.1</u>	Bacillus pumilus strain CT13 16S ribosomal RNA gene, part	<u>460</u>	460	55%	2e-126	98%
<u>EU624429.1</u>	Bacillus pumilus strain S6-05 16S ribosomal RNA gene, par	<u>460</u>	460	55%	2e-126	98%
<u>EU537588.1</u>	Uncultured bacterium clone nbt:74e09 16S ribosomal RNA g	<u>460</u>	460	55%	2e-126	98%
<u>EU070368.1</u>	Bacillus sp. B351(C)Ydz-jj 16S ribosomal RNA gene, partia	<u>460</u>	460	55%	2e-126	98%
<u>EU652063.1</u>	Bacillus anthracis strain me-12 16S ribosomal RNA gene, p	<u>460</u>	460	55%	2e-126	98%
<u>EU589284.1</u>	Uncultured soil bacterium clone 2_B3 16S ribosomal RNA g	<u>460</u>	460	55%	2e-126	98%
<u>EU558973.1</u>	Bacillus sp. cp-h23 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	<u>460</u>	460	55%	2e-126	98%
<u>EU253497.1</u>	Bacillus pumilus isolate ASW4 16S ribosomal RNA gene, pa	<u>460</u>	460	55%	2e-126	98%
<u>EU253493.1</u>	Bacillus pumilus isolate ASW3 16S ribosomal RNA gene, pa	<u>460</u>	460	55%	2e-126	98%
<u>AM944032.1</u>	Bacillus sp. R-25542 partial 16S rRNA gene, isolate R-2554	<u>460</u>	460	55%	2e-126	98%
<u>AM943986.1</u>	Uncultured Bacillus sp. partial 16S rRNA gene, clone 115	<u>460</u>	460	55%	2e-126	98%
<u>AM943984.1</u>	Uncultured Bacillus sp. partial 16S rRNA gene, clone 71	<u>460</u>	460	55%	2e-126	98%
<u>EU520340.1</u>	Bacterium SE5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>460</u>	460	55%	2e-126	98%
<u>AJ831844.2</u>	Bacillus sp. 28K partial 16S rRNA gene, strain 28K	<u>460</u>	460	55%	2e-126	98%

Lampiran IV.7. Hasil BLAST data sequence gen 16S rRNA, isolat T17.

Accession	Description	Max. Identity	Total Matches	Query Coverage	E-value	Max. Identity
<u>EU589284.1</u>	Uncultured soil bacterium clone 2_B3 16S ribosomal RNA g	<u>477</u>	477	77%	1e-131	95%
<u>EF032679.1</u>	Bacillus pumilus strain AU39 16S ribosomal RNA gene, part	<u>472</u>	472	77%	7e-130	95%
<u>EU624429.1</u>	Bacillus pumilus strain S6-05 16S ribosomal RNA gene, par	<u>466</u>	466	77%	3e-128	94%
<u>EU537588.1</u>	Uncultured bacterium clone nbt74e09 16S ribosomal RNA g	<u>466</u>	466	77%	3e-128	94%
<u>EU661810.1</u>	Bacillus sp. B-26 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	<u>466</u>	466	77%	3e-128	94%
<u>EU661798.1</u>	Bacillus sp. A-28 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	<u>466</u>	466	77%	3e-128	94%
<u>EU661797.1</u>	Bacillus sp. C-33 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	<u>466</u>	466	77%	3e-128	94%
<u>EU661788.1</u>	Bacillus sp. C-3(2008) 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	<u>466</u>	466	77%	3e-128	94%
<u>EU647546.1</u>	Uncultured Bacillus sp. clone 33 16S ribosomal RNA gene, I	<u>466</u>	466	77%	3e-128	94%
<u>EU652879.1</u>	Bacillus sp. ZY011 16S ribosomal RNA gene, partial sequer	<u>466</u>	466	77%	3e-128	94%
<u>EU418725.1</u>	Bacillus pumilus strain GM35 16S ribosomal RNA gene, par	<u>466</u>	466	77%	3e-128	94%
<u>EU244774.1</u>	Bacillus sp. 69 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>466</u>	466	77%	3e-128	94%
<u>EU070406.1</u>	Bacillus sp. By253Ydz-fq 16S ribosomal RNA gene, partial :	<u>466</u>	466	77%	3e-128	94%
<u>EU070389.1</u>	Bacillus sp. By140Ydz-ss 16S ribosomal RNA gene, partial :	<u>466</u>	466	77%	3e-128	94%
<u>EU070368.1</u>	Bacillus sp. B351(C)Ydz-jj 16S ribosomal RNA gene, partia	<u>466</u>	466	77%	3e-128	94%
<u>EU652063.1</u>	Bacillus anthracis strain me-12 16S ribosomal RNA gene, p	<u>466</u>	466	77%	3e-128	94%
<u>EU97741.1</u>	Bacillus pumilus strain NMRL PED3 16S ribosomal RNA gene	<u>466</u>	466	77%	3e-128	94%
<u>EU596537.1</u>	Bacillus pumilus strain HN005 16S ribosomal RNA gene, pa	<u>466</u>	466	77%	3e-128	94%
<u>EU558973.1</u>	Bacillus sp. cp-h23 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	<u>466</u>	466	77%	3e-128	94%
<u>AM944032.1</u>	Bacillus sp. R-25542 partial 16S rRNA gene, isolate R-2554	<u>466</u>	466	77%	3e-128	94%

Lampiran IV.8. Hasil BLAST data sequence gen 16S rRNA, isolat T28

Accession	Description	YBP Size	YBP Score	YBP E-value	YBP Ident	YBP Max Ident
<u>AM778191.1</u>	Bacillus pumilus partial 16S rRNA gene, strain DURCK14	789	789	99%	0.0	99%
<u>EU624429.1</u>	Bacillus pumilus strain S6-05 16S ribosomal RNA gene, par	782	782	99%	0.0	98%
<u>EU652063.1</u>	Bacillus anthracis strain me-12 16S ribosomal RNA gene, p	782	782	99%	0.0	98%
<u>EU558973.1</u>	Bacillus sp. cp-h23 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	782	782	99%	0.0	98%
<u>AM944033.1</u>	Bacillus sp. R-28766 partial 16S rRNA gene, isolate R-2876	782	782	99%	0.0	98%
<u>AM943986.1</u>	Uncultured Bacillus sp. partial 16S rRNA gene, clone 115	782	782	99%	0.0	98%
<u>AM943984.1</u>	Uncultured Bacillus sp. partial 16S rRNA gene, clone 71	782	782	99%	0.0	98%
<u>AJ831844.2</u>	Bacillus sp. 28K partial 16S rRNA gene, strain 28K	782	782	99%	0.0	98%
<u>AJ831841.2</u>	Bacillus sp. 41KF2a partial 16S rRNA gene, strain 41KF2a	782	782	99%	0.0	98%
<u>EF426450.1</u>	Bacillus sp. L6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	782	782	99%	0.0	98%
<u>EU417659.1</u>	Bacillus sp. 3LF21TD 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	782	782	99%	0.0	98%
<u>DQ358683.1</u>	Bacillus sp. YIM DH19 16S ribosomal RNA gene, partial seq	782	782	99%	0.0	98%
<u>EF055450.1</u>	Bacillus pumilus isolate strain KER1 16S ribosomal RNA ge	782	782	99%	0.0	98%
<u>EU350368.1</u>	Bacillus pumilus strain ST312 16S ribosomal RNA gene, pai	782	782	99%	0.0	98%
<u>EU350367.1</u>	Bacillus pumilus strain ST304 16S ribosomal RNA gene, pai	782	782	99%	0.0	98%
<u>AM921626.1</u>	Bacillus pumilus partial 16S rRNA gene, isolate PhyCEm-11	782	782	99%	0.0	98%
<u>AB361365.1</u>	Bacillus pumilus gene for 16S rRNA, partial sequence, strai	782	782	99%	0.0	98%
<u>AB361364.1</u>	Bacillus pumilus gene for 16S rRNA, partial sequence, strai	782	782	99%	0.0	98%
<u>AB361363.1</u>	Bacillus pumilus gene for 16S rRNA, partial sequence, strai	782	782	99%	0.0	98%
<u>EU311215.1</u>	Bacillus pumilus strain NB-1 16S ribosomal RNA gene, part	782	782	99%	0.0	98%



Lampiran IV.9. Hasil BLAST data sequence gen 16S rRNA, isolat T1

Accession	Accession	Max score	Ident value	Identy percentage	E- value	Query start
<u>DQ990021.1</u>	Bacterium 1-gw2-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	<u>669</u>	669	98%	0.0	97%
<u>DQ990025.1</u>	Bacterium 1-gw3-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	<u>664</u>	664	98%	0.0	97%
<u>EU624429.1</u>	Bacillus pumilus strain S6-05 16S ribosomal RNA gene, par	<u>662</u>	662	92%	0.0	99%
<u>EU661810.1</u>	Bacillus sp. B-26 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	<u>662</u>	662	92%	0.0	99%
<u>EU661798.1</u>	Bacillus sp. A-28 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	<u>662</u>	662	92%	0.0	99%
<u>EU661797.1</u>	Bacillus sp. C-33 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	<u>662</u>	662	92%	0.0	99%
<u>EU661788.1</u>	Bacillus sp. C-3(2008) 16S ribosomal RNA gene, partial seq	<u>662</u>	662	92%	0.0	99%
<u>EU647546.1</u>	Uncultured Bacillus sp. clone 33 16S ribosomal RNA gene, I	<u>662</u>	662	92%	0.0	99%
<u>EU652879.1</u>	Bacillus sp. ZY011 16S ribosomal RNA gene, partial sequer	<u>662</u>	662	92%	0.0	99%
<u>EU418725.1</u>	Bacillus pumilus strain GM35 16S ribosomal RNA gene, par	<u>662</u>	662	92%	0.0	99%
<u>EU244774.1</u>	Bacillus sp. 69 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>662</u>	662	92%	0.0	99%
<u>EU070406.1</u>	Bacillus sp. By253Ydz-fq 16S ribosomal RNA gene, partial :	<u>662</u>	662	92%	0.0	99%
<u>EU070389.1</u>	Bacillus sp. By140Ydz-ss 16S ribosomal RNA gene, partial :	<u>662</u>	662	92%	0.0	99%
<u>EU070368.1</u>	Bacillus sp. B351(C)Ydz-jj 16S ribosomal RNA gene, partia	<u>662</u>	662	92%	0.0	99%
<u>EU652063.1</u>	Bacillus anthracis strain me-12 16S ribosomal RNA gene, p	<u>662</u>	662	92%	0.0	99%
<u>EU597741.1</u>	Bacillus pumilus strain NMRL PED3 16S ribosomal RNA gen	<u>662</u>	662	92%	0.0	99%
<u>EU596537.1</u>	Bacillus pumilus strain HN005 16S ribosomal RNA gene, pa	<u>662</u>	662	92%	0.0	99%
<u>EU558973.1</u>	Bacillus sp. cp-h23 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	<u>662</u>	662	92%	0.0	99%
<u>AM944032.1</u>	Bacillus sp. R-25542 partial 16S rRNA gene, isolate R-2554	<u>662</u>	662	92%	0.0	99%
<u>AM943987.1</u>	Uncultured Bacillus sp. partial 16S rRNA gene, clone 61	<u>662</u>	662	92%	0.0	99%

Lampiran IV.10. Hasil BLAST data sequence gen 16S rRNA, isolat P11

Accession	Description	Max Score	Ident Score	Query Coverage	E- value	Max Ident (bits)
<u>EU330341.1</u>	Bacillus sp. BSI20565 16S ribosomal RNA gene, partial se	<u>793</u>	793	98%	0.0	98%
<u>DQ365587.1</u>	Bacillus flexus strain GS11 16S ribosomal RNA gene, part	<u>793</u>	793	98%	0.0	98%
<u>AJ784845.1</u>	Bacillus sp. Con a/4 partial 16S rRNA gene, isolate Con a	<u>793</u>	793	98%	0.0	98%
<u>AJ563600.1</u>	Bacillus flexus partial 16S rRNA gene, strain B14	<u>793</u>	793	98%	0.0	98%
<u>DQ270752.1</u>	Bacillus sp. B-2036 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	<u>793</u>	793	98%	0.0	98%
<u>AB021185.1</u>	Bacillus flexus gene for 16S ribosomal RNA	<u>793</u>	793	98%	0.0	98%
<u>DQ339687.1</u>	Bacillus flexus isolate BRL02-65 16S ribosomal RNA gene,	<u>791</u>	791	98%	0.0	98%
<u>AF217809.1</u>	Bacillus sp. KJ963 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	<u>789</u>	789	98%	0.0	98%
<u>DQ416791.1</u>	Bacillus sp. G1DM-53 16S ribosomal RNA gene, partial se	<u>787</u>	787	98%	0.0	98%
<u>DQ339292.1</u>	Bacillus flexus isolate LLH 16S ribosomal RNA gene, partiz	<u>787</u>	787	98%	0.0	98%
<u>DQ514312.1</u>	Bacillus flexus strain P27-25 16S ribosomal RNA gene, pa	<u>787</u>	787	98%	0.0	98%
<u>AJ550461.1</u>	Bacillus flexus partial 16S rRNA gene	<u>787</u>	787	98%	0.0	98%
<u>AM778192.1</u>	Bacillus flexus partial 16S rRNA gene, strain DURCK15	<u>784</u>	784	99%	0.0	98%
<u>AM992190.1</u>	Bacillus flexus partial 16S rRNA gene, isolate TS IW 14	<u>782</u>	782	98%	0.0	98%
<u>EU588725.1</u>	Bacillus flexus strain BI204 16S ribosomal RNA gene, part	<u>782</u>	782	98%	0.0	98%
<u>EU257221.1</u>	Bacillus sp. BY104(B)Ydz-dh 16S ribosomal RNA gene, pa	<u>782</u>	782	98%	0.0	98%
<u>EU283319.1</u>	Bacillus flexus strain NIOB 554 16S ribosomal RNA gene,	<u>782</u>	782	97%	0.0	98%
<u>AY647285.1</u>	Bacillus flexus strain MSU1610 16S ribosomal RNA gene, I	<u>778</u>	778	98%	0.0	98%
<u>AY422986.1</u>	Bacillus flexus 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>778</u>	778	97%	0.0	98%
<u>EU070384.1</u>	Bacillus sp. By107(B)Ydz-dh 16S ribosomal RNA gene, pa	<u>776</u>	776	96%	0.0	99%

## Lampiran IV.11. Hasil BLAST data sequence gen 16S rRNA, isolat S23

Accession	Description	Max score	Ident	Ident %	Gap	Ident %
<u>EU070372.1</u>	Bacillus sp. By231Ydz-fq 16S ribosomal RNA gene, partial	<u>684</u>	684	91%	0.0	96%
<u>EU037277.1</u>	Bacillus sp. G3DM-19 16S ribosomal RNA gene, partial se	<u>684</u>	684	91%	0.0	96%
<u>AY647307.1</u>	Bacillus aquimaris strain MSU1110 16S ribosomal RNA, pa	<u>684</u>	684	91%	0.0	96%
<u>AM990861.1</u>	Bacillus sp. MOLA 87 partial 16S rRNA gene, culture collec	<u>667</u>	667	91%	0.0	96%
<u>AM950308.1</u>	Bacillus sp. DS1 HS-2008 partial 16S rRNA gene, isolate C	<u>667</u>	667	91%	0.0	96%
<u>DQ923229.1</u>	Bacillus sp. m2-43 16S ribosomal RNA gene, partial seque	<u>667</u>	667	91%	0.0	96%
<u>DQ923228.1</u>	Bacillus sp. m2-40 16S ribosomal RNA gene, partial seque	<u>667</u>	667	91%	0.0	96%
<u>DQ923227.1</u>	Bacillus sp. m2-39 16S ribosomal RNA gene, partial seque	<u>667</u>	667	91%	0.0	96%
<u>DQ923226.1</u>	Bacillus sp. m2-38 16S ribosomal RNA gene, partial seque	<u>667</u>	667	91%	0.0	96%
<u>DQ923225.1</u>	Bacillus sp. m2-36 16S ribosomal RNA gene, partial seque	<u>667</u>	667	91%	0.0	96%
<u>DQ923224.1</u>	Bacillus sp. m2-35 16S ribosomal RNA gene, partial seque	<u>667</u>	667	91%	0.0	96%
<u>DQ923222.1</u>	Bacillus sp. m2-33 16S ribosomal RNA gene, partial seque	<u>667</u>	667	91%	0.0	96%
<u>DQ923217.1</u>	Bacillus sp. m3-18 16S ribosomal RNA gene, partial seque	<u>667</u>	667	91%	0.0	96%
<u>DQ084469.1</u>	Bacillus sp. CSS-8 16S ribosomal RNA gene, partial seque	<u>667</u>	667	91%	0.0	96%
<u>DQ923223.1</u>	Bacillus sp. m2-34 16S ribosomal RNA gene, partial seque	<u>662</u>	662	91%	0.0	95%
<u>AB126757.1</u>	Bacillus sp. KR4 gene for 16S ribosomal RNA, partial seq	<u>660</u>	660	91%	0.0	95%
<u>EU443752.1</u>	Bacillus aquimaris strain CHN9 16S ribosomal RNA gene,	<u>658</u>	658	88%	0.0	96%
<u>EU143349.1</u>	Bacillus sp. J28 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	<u>658</u>	658	91%	0.0	95%
<u>EU624438.1</u>	Bacillus aquimaris strain S6-14 16S ribosomal RNA gene,	<u>656</u>	656	91%	0.0	95%
<u>DQ923221.1</u>	Bacillus sp. m2-29 16S ribosomal RNA gene, partial seque	<u>656</u>	656	91%	0.0	95%

Lampiran IV.12. Hasil BLAST data sequence gen 16S rRNA, isolat T18

Accession	Name/strain	Max id	Ident Score	Ident Percentage	E- value	Bits
<u>AM983525.1</u>	Bacillus sp. K38T partial 16S rRNA gene, isolate K38T	<u>765</u>	765	98%	0.0	99%
<u>EU417668.1</u>	Bacillus sp. SK47 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	<u>760</u>	760	98%	0.0	99%
<u>EF029507.1</u>	Uncultured bacterium clone U58 16S ribosomal RNA gene,	<u>760</u>	760	98%	0.0	99%
<u>AF326371.1</u>	Bacillus sp. PL-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	<u>760</u>	760	98%	0.0	99%
<u>AM177061.1</u>	Bacillus sp. PeC11 partial 16S rRNA gene, strain PeC11	<u>760</u>	760	98%	0.0	99%
<u>AJ785994.1</u>	Firmicutes bacterium TH-H12 partial 16S rRNA gene	<u>756</u>	756	98%	0.0	99%
<u>AM183350.1</u>	Bacillus sp. P154 partial 16S rRNA gene, isolate P154	<u>754</u>	754	98%	0.0	99%
<u>DQ079005.1</u>	Bacillus sp. GB02-12/A/B 16S ribosomal RNA gene, partial	<u>754</u>	754	98%	0.0	99%
<u>DQ078999.1</u>	Bacillus sp. GB02-10/11/15 16S ribosomal RNA gene, part	<u>754</u>	754	98%	0.0	99%
<u>DQ078998.1</u>	Bacillus sp. GB02-21B/C 16S ribosomal RNA gene, partial	<u>754</u>	754	98%	0.0	99%
<u>DQ371431.1</u>	Bacillus sp. BMP-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	<u>754</u>	754	98%	0.0	99%
<u>AF326366.1</u>	Bacillus sp. PL-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	<u>754</u>	754	98%	0.0	99%
<u>AF326363.1</u>	Bacillus sp. MB-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	<u>754</u>	754	98%	0.0	99%
<u>AB198720.1</u>	Bacillus boroniphilus gene for 16S rRNA, partial sequence,	<u>754</u>	754	98%	0.0	99%
<u>AB198719.1</u>	Bacillus boroniphilus gene for 16S rRNA, partial sequence,	<u>754</u>	754	98%	0.0	99%
<u>AB198718.1</u>	Bacillus boroniphilus gene for 16S rRNA, partial sequence,	<u>754</u>	754	98%	0.0	99%
<u>AF221062.1</u>	Bacillus sp. YKJ-11 16S ribosomal RNA gene, partial seque	<u>754</u>	754	98%	0.0	99%
<u>AF221061.1</u>	Bacillus sp. YKJ-10 16S ribosomal RNA gene, partial seque	<u>754</u>	754	98%	0.0	99%
<u>AJ784105.1</u>	Bacillus sp. KE1-02 partial 16S rRNA gene	<u>750</u>	750	98%	0.0	99%
<u>AY937036.1</u>	Uncultured marine bacterium clone QMU-3289 16S ribosom	<u>750</u>	750	98%	0.0	99%

## Lampiran IV.13. Hasil BLAST data sequence gen 16S rRNA, isolat K52

Sequences producing significant alignments:		Score (Bits)	E Value
<u>gb AY211104.1 </u>	Bacillus sp. 'Mali 10' 16S ribosomal RNA gene, ...	706	0.0
<u>dbj AB126757.1 </u>	Bacillus sp. KR4 gene for 16S ribosomal RNA, ...	706	0.0
<u>dbj AB126756.1 </u>	Bacillus sp. KR1 gene for 16S ribosomal RNA, ...	704	0.0
<u>emb AM990861.1 </u>	Bacillus sp. MDLA 87 partial 16S rRNA gene, c...	701	0.0
<u>gb DQ084469.1 </u>	Bacillus sp. CSS-8 16S ribosomal RNA gene, par...	701	0.0
<u>gb DQ923229.1 </u>	Bacillus sp. m2-43 16S ribosomal RNA gene, par...	695	0.0
<u>gb DQ923228.1 </u>	Bacillus sp. m2-40 16S ribosomal RNA gene, par...	695	0.0
<u>gb DQ923227.1 </u>	Bacillus sp. m2-39 16S ribosomal RNA gene, par...	695	0.0
<u>gb DQ923226.1 </u>	Bacillus sp. m2-38 16S ribosomal RNA gene, par...	695	0.0
<u>gb DQ923225.1 </u>	Bacillus sp. m2-36 16S ribosomal RNA gene, par...	695	0.0
<u>gb DQ923224.1 </u>	Bacillus sp. m2-35 16S ribosomal RNA gene, par...	695	0.0
<u>gb DQ923222.1 </u>	Bacillus sp. m2-33 16S ribosomal RNA gene, par...	695	0.0
<u>gb DQ923217.1 </u>	Bacillus sp. m3-18 16S ribosomal RNA gene, par...	695	0.0
<u>gb AY911012.1 </u>	Marine sediment bacterium ISA-6170 16S ribosom...	693	0.0
<u>gb EU624438.1 </u>	Bacillus aquimaris strain S6-14 16S ribosomal ...	689	0.0
<u>gb EU037277.1 </u>	Bacillus sp. G3DM-19 16S ribosomal RNA gene, p...	689	0.0
<u>gb DQ328952.1 </u>	Bacillus sp. BUDY-28 16S ribosomal RNA gene, p...	689	0.0
<u>gb EU417657.1 </u>	Bacillus sp. 5.5LF14BP 16S ribosomal RNA gene, ...	684	0.0
<u>gb DQ923221.1 </u>	Bacillus sp. m2-29 16S ribosomal RNA gene, par...	684	0.0
<u>gb DQ923223.1 </u>	Bacillus sp. m2-34 16S ribosomal RNA gene, par...	682	0.0
<u>gb EU143349.1 </u>	Bacillus sp. J28 16S ribosomal RNA gene, parti...	676	0.0
<u>gb DQ985062.1 </u>	Bacillus sp. JL1082 16S ribosomal RNA gene, pa...	676	0.0
<u>gb AY745867.1 </u>	Bacillus sp. JL-29 16S ribosomal RNA gene, par...	676	0.0
<u>gb AY646165.1 </u>	Bacillus sp. JL-29 16S ribosomal RNA gene, par...	676	0.0
<u>gb AY936953.1 </u>	Marine sediment bacterium ISA-3163 16S ribosom...	676	0.0

Lampiran IV.14. Hasil BLAST data sequence gen 16S rRNA, isolat P7

Accession	Description	Max Score	Query Coverage	Identical Score	Query Coverage	Max Ident.
<u>AY211104.1</u>	Bacillus sp. 'Mali 10' 16S ribosomal RNA gene, partial seq.	<u>701</u>	99%	701	0.0	97%
<u>AY911012.1</u>	Marine sediment bacterium ISA-6170 16S ribosomal RNA	<u>686</u>	97%	686	0.0	97%
<u>AY911021.1</u>	Marine sediment bacterium ISA-6173 16S ribosomal RNA	<u>676</u>	95%	676	0.0	97%
<u>AB126757.1</u>	Bacillus sp. KR4 gene for 16S ribosomal RNA, partial seq.	<u>667</u>	99%	667	0.0	96%
<u>AB126756.1</u>	Bacillus sp. KR1 gene for 16S ribosomal RNA, partial seq.	<u>667</u>	99%	667	0.0	96%
<u>AM990861.1</u>	Bacillus sp. MOLA 87 partial 16S rRNA gene, culture collec.	<u>664</u>	99%	664	0.0	95%
<u>DQ923229.1</u>	Bacillus sp. m2-43 16S ribosomal RNA gene, partial seque	<u>664</u>	99%	664	0.0	95%
<u>DQ923228.1</u>	Bacillus sp. m2-40 16S ribosomal RNA gene, partial seque	<u>664</u>	99%	664	0.0	95%
<u>DQ923227.1</u>	Bacillus sp. m2-39 16S ribosomal RNA gene, partial seque	<u>664</u>	99%	664	0.0	95%
<u>DQ923226.1</u>	Bacillus sp. m2-38 16S ribosomal RNA gene, partial seque	<u>664</u>	99%	664	0.0	95%
<u>DQ923225.1</u>	Bacillus sp. m2-36 16S ribosomal RNA gene, partial seque	<u>664</u>	99%	664	0.0	95%
<u>DQ923224.1</u>	Bacillus sp. m2-35 16S ribosomal RNA gene, partial seque	<u>664</u>	99%	664	0.0	95%
<u>DQ923222.1</u>	Bacillus sp. m2-33 16S ribosomal RNA gene, partial seque	<u>664</u>	99%	664	0.0	95%
<u>DQ923217.1</u>	Bacillus sp. m3-18 16S ribosomal RNA gene, partial seque	<u>664</u>	99%	664	0.0	95%
<u>DQ084469.1</u>	Bacillus sp. CSS-8 16S ribosomal RNA gene, partial seque	<u>664</u>	99%	664	0.0	95%
<u>EU037277.1</u>	Bacillus sp. G3DM-19 16S ribosomal RNA gene, partial sei	<u>658</u>	99%	658	0.0	95%
<u>EU231635.1</u>	Bacillus aquimaris strain TCCC11050 16S ribosomal RNA	<u>658</u>	98%	658	0.0	95%
<u>EU231632.1</u>	Bacillus aquimaris strain TCCC11049 16S ribosomal RNA	<u>658</u>	98%	658	0.0	95%
<u>AY211108.1</u>	Bacillus sp. 'Mali 14' 16S ribosomal RNA gene, partial seq.	<u>658</u>	98%	658	0.0	95%
<u>EU231621.1</u>	Bacillus alcalophilus strain TCCC11004 16S ribosomal RN	<u>652</u>	98%	652	0.0	95%

Lampiran IV.15. Hasil BLAST data sequence gen 16S rRNA, isolat T21

Accession	Description	Map score	Ident score	Ident value	Max ident
<u>EF636891.1</u>	Bacillus sp. WRB-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	<u>621</u>	621	95%	7e-175
<u>AM902212.1</u>	Bacillus sp. VB91 partial 16S rRNA gene, strain VB91	<u>621</u>	621	95%	7e-175
<u>D88778.1</u>	Bacillus sp. DSK25 gene for 16S ribosomal RNA	<u>621</u>	621	95%	7e-175
<u>DQ517142.1</u>	Bacterium SL4.53 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	<u>601</u>	601	93%	9e-169
<u>DQ517141.1</u>	Bacterium SL4.52 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	<u>593</u>	593	92%	1e-166
<u>AF281158.1</u>	Bacillus kangii 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>555</u>	555	95%	7e-155
<u>DQ319055.1</u>	Bacillus sp. SC-D1-6 16S ribosomal RNA gene, partial seq	<u>545</u>	545	95%	4e-152
<u>AY745869.1</u>	Bacillus sp. JL-31 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	<u>544</u>	544	95%	1e-151
<u>AY745824.1</u>	Bacillus sp. JL-26 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	<u>544</u>	544	95%	1e-151
<u>AY911137.1</u>	Marine sediment bacterium ISA-7267 16S ribosomal RNA g	<u>534</u>	534	93%	9e-149
<u>AY887129.1</u>	Bacillus licheniformis strain AnBa7 16S ribosomal RNA gen	<u>492</u>	492	95%	5e-136
<u>AB020195.1</u>	Bacillus sp. DNA for 16S ribosomal RNA, strain TGS437	<u>492</u>	492	95%	5e-136
<u>AY344958.1</u>	Uncultured bacterium clone ARRS94 16S rDNA ribosomal R	<u>490</u>	490	95%	2e-135
<u>EU221363.1</u>	Bacillus badius strain B2S2 16S ribosomal RNA gene, parti	<u>488</u>	488	95%	7e-135
<u>DQ416780.1</u>	Bacillus sp. G1DM-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	<u>486</u>	486	95%	3e-134
<u>EU124552.1</u>	Bacillus licheniformis strain OSS 1 16S ribosomal RNA gen	<u>486</u>	486	95%	3e-134
<u>EF611181.1</u>	Bacillus licheniformis strain QUCASBSD-3 16S ribosomal R	<u>486</u>	486	95%	3e-134
<u>EF471917.1</u>	Bacillus sp. J24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>486</u>	486	95%	3e-134
<u>DQ298087.1</u>	Bacillus licheniformis isolate AD4B 16S ribosomal RNA gen	<u>486</u>	486	95%	3e-134
<u>DQ351930.2</u>	Bacillus licheniformis strain K10 16S ribosomal RNA gene, J	<u>486</u>	486	95%	3e-134

Lampiran IV.16. Hasil BLAST data sequence gen 16S rRNA, isolat T26

Accession	Description	Map Gene	Total Score	Query Coverage	E value	Max Ident
<u>DQ517141.1</u>	Bacterium SL4.52 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	<u>641</u>	641	92%	0.0	97%
<u>EF636891.1</u>	Bacillus sp. WRB-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	<u>638</u>	638	92%	7e-180	97%
<u>AM902212.1</u>	Bacillus sp. VB91 partial 16S rRNA gene, strain VB91	<u>638</u>	638	92%	7e-180	97%
<u>DQ517142.1</u>	Bacterium SL4.53 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	<u>638</u>	638	92%	7e-180	97%
<u>D88778.1</u>	Bacillus sp. DSK25 gene for 16S ribosomal RNA	<u>638</u>	638	92%	7e-180	97%
<u>AF281158.1</u>	Bacillus kangii 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>571</u>	571	92%	7e-160	94%
<u>AY911137.1</u>	Marine sediment bacterium ISA-7267 16S ribosomal RNA g	<u>566</u>	566	92%	3e-158	93%
<u>DQ319055.1</u>	Bacillus sp. SC-D1-6 16S ribosomal RNA gene, partial seq	<u>566</u>	566	92%	3e-158	93%
<u>AY745869.1</u>	Bacillus sp. JL-31 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	<u>560</u>	560	92%	2e-156	93%
<u>AY745824.1</u>	Bacillus sp. JL-26 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	<u>560</u>	560	92%	2e-156	93%
<u>AY310301.1</u>	Bacillus subtilis strain BGSC 3A23 16S ribosomal RNA (rntI	<u>520</u>	520	92%	3e-144	91%
<u>EF695625.1</u>	Uncultured Bacilli bacterium clone MS008A1_A10 16S ribos	<u>514</u>	514	92%	1e-142	91%
<u>AY344958.1</u>	Uncultured bacterium clone ARRS94 16S rDNA ribosomal R	<u>514</u>	514	92%	1e-142	91%
<u>AY887129.1</u>	Bacillus licheniformis strain AnBa7 16S ribosomal RNA gene	<u>514</u>	514	92%	1e-142	91%
<u>AB020195.1</u>	Bacillus sp. DNA for 16S ribosomal RNA, strain TGS437	<u>514</u>	514	92%	1e-142	91%
<u>FJ221363.1</u>	Bacillus badius strain B2S2 16S ribosomal RNA gene, partit	<u>510</u>	510	92%	2e-141	91%
<u>EF611181.1</u>	Bacillus licheniformis strain QUCASBSD-3 16S ribosomal R	<u>510</u>	510	92%	2e-141	91%
<u>EU621908.1</u>	Bacillus sp. CCBAU 10706 16S ribosomal RNA gene, partia	<u>508</u>	508	92%	6e-141	91%
<u>EU586322.1</u>	Bacillus licheniformis strain H*1 16S ribosomal RNA gene, I	<u>508</u>	508	92%	6e-141	91%
<u>AM950314.1</u>	Bacillus sp. US4 HS-2008 partial 16S rRNA gene, isolate US	<u>508</u>	508	92%	6e-141	91%



## Lampiran IV.17. Hasil BLAST data sequence gen 16S rRNA, isolat T9

Accession	Description	Max Score	Ident Score	Ident Percentage	E- value	Query Cover
<u>AY289508.1</u>	Bacillus sp. IDA5367 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	<u>682</u>	682	98%	0.0	96%
<u>AF539653.1</u>	Bacillus sp. Ni12 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	<u>680</u>	680	99%	0.0	96%
<u>DQ334353.1</u>	Bacterium CWISO15 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	<u>678</u>	678	99%	0.0	96%
<u>EU620412.1</u>	Bacillus subtilis strain S8-04 16S ribosomal RNA gene, part	<u>676</u>	676	98%	0.0	96%
<u>AM990708.1</u>	Bacillus sp. MOLA 441 partial 16S rRNA gene, culture collec	<u>676</u>	676	98%	0.0	96%
<u>EU652059.1</u>	Bacillus sp. me-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	<u>676</u>	676	98%	0.0	96%
<u>AM983484.1</u>	Bacillus sp. SB7T partial 16S rRNA gene, isolate SB7T	<u>676</u>	676	98%	0.0	96%
<u>AM983478.1</u>	Bacillus sp. SA4T partial 16S rRNA gene, isolate SA4T	<u>676</u>	676	98%	0.0	96%
<u>AM983466.1</u>	Bacillus sp. SB20T partial 16S rRNA gene, isolate SB20T	<u>676</u>	676	98%	0.0	96%
<u>EU584514.1</u>	Bacillus sp. Everest-gws-30 16S ribosomal RNA gene, parti	<u>676</u>	676	98%	0.0	96%
<u>EU373361.1</u>	Bacillus sp. HNL20 16S ribosomal RNA gene, partial sequer	<u>676</u>	676	98%	0.0	96%
<u>EU373353.1</u>	Bacillus sp. HNL15 16S ribosomal RNA gene, partial sequer	<u>676</u>	676	98%	0.0	96%
<u>EU373351.1</u>	Bacillus sp. HNR07 16S ribosomal RNA gene, partial sequer	<u>676</u>	676	98%	0.0	96%
<u>AB366328.1</u>	Bacillus megaterium gene for 16S ribosomal RNA, partial s	<u>676</u>	676	98%	0.0	96%
<u>AB428797.1</u>	Bacillus megaterium gene for 16S rRNA, partial sequence,	<u>676</u>	676	98%	0.0	96%
<u>EF426445.1</u>	Bacillus sp. L1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>676</u>	676	98%	0.0	96%
<u>EU175920.1</u>	Uncultured Bacillus sp. clone iso4_1 16S ribosomal RNA ge	<u>676</u>	676	98%	0.0	96%
<u>DQ416802.1</u>	Bacillus sp. G2DM-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequi	<u>676</u>	676	98%	0.0	96%
<u>EU368774.1</u>	Bacillus sp. B16(A) Ydz-xg 16S ribosomal RNA gene, partia	<u>676</u>	676	98%	0.0	96%
<u>AM931277.1</u>	Bacillus megaterium partial 16S rRNA gene, isolate LR-49	<u>676</u>	676	98%	0.0	96%

Lampiran IV.18. Hasil BLAST data *sequence* gen 16S rRNA, isolat S9

Accession	Description	Max Score	Identical Percent	Query Cover	Match Length	Gap Percent	
<u>DQ517116.1</u>	Bacterium SL4.19 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	<u>702</u>	100%	0.0	702	0.0	99%
<u>EU539669.1</u>	Uncultured bacterium clone nbt243h01 16S ribosomal RNA	<u>697</u>	100%	0.0	697	0.0	99%
<u>EU196531.1</u>	Micrococcus luteus clone B14 16S ribosomal RNA gene, par	<u>691</u>	100%	0.0	691	0.0	99%
<u>EF491952.1</u>	Micrococcus sp. OS2 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	<u>691</u>	100%	0.0	691	0.0	99%
<u>EF522134.1</u>	Micrococcus sp. CU207 16S ribosomal RNA gene, partial se	<u>691</u>	100%	0.0	691	0.0	99%
<u>DQ870744.1</u>	Micrococcus indicus strain JPLtot3-3 16S ribosomal RNA (rr	<u>691</u>	100%	0.0	691	0.0	99%
<u>DQ660308.1</u>	Micrococcus chenggongense strain AS1.3025 16S ribosoma	<u>691</u>	100%	0.0	691	0.0	99%
<u>AM235879.1</u>	Micrococcus sp. A7 16S rRNA gene, strain A7	<u>691</u>	100%	0.0	691	0.0	99%
<u>AY957680.1</u>	Uncultured bacterium clone P3DKC07 16S small subunit rib	<u>691</u>	100%	0.0	691	0.0	99%
<u>AY957679.1</u>	Uncultured bacterium clone P3DKC11 16S small subunit rib	<u>691</u>	100%	0.0	691	0.0	99%
<u>AY957671.1</u>	Uncultured bacterium clone P3DKC09 16S small subunit rib	<u>691</u>	100%	0.0	691	0.0	99%
<u>AY439223.1</u>	Micrococcus sp. GIC11 16S ribosomal RNA gene, partial se	<u>691</u>	100%	0.0	691	0.0	99%
<u>DQ329340.1</u>	Bacterium C22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>691</u>	100%	0.0	691	0.0	99%
<u>EU540527.1</u>	Uncultured bacterium clone nbt119b02 16S ribosomal RNA	<u>686</u>	100%	0.0	686	0.0	98%
<u>EU135627.1</u>	Arthrobacter sp. YIM C348 16S ribosomal RNA gene, partia	<u>686</u>	100%	0.0	686	0.0	98%
<u>EU029573.1</u>	Uncultured Arthrobacter sp. clone T8149 16S ribosomal RN.	<u>686</u>	100%	0.0	686	0.0	98%
<u>AM403126.1</u>	Micrococcus sp. V7 partial 16S rRNA gene, strain V7	<u>686</u>	100%	0.0	686	0.0	98%
<u>AY957757.1</u>	Uncultured bacterium clone P3DKA09 16S small subunit rib	<u>686</u>	100%	0.0	686	0.0	98%
<u>AF227843.1</u>	Bacterium str. 71381 16S ribosomal RNA gene, partial seql	<u>678</u>	100%	0.0	678	0.0	98%
<u>AF194538.1</u>	Methylobacterium sp. 6G 16S ribosomal RNA gene, partial	<u>673</u>	100%	0.0	673	0.0	98%

Lampiran IV.19. Hasil BLAST data sequence gen 16S rRNA, isolat T23

Accession	Accession	Match	Identical	Query Coverage	E-Value	Identity
<u>AY211096.1</u>	Micrococcus sp. 'Mali 2' 16S ribosomal RNA gene, partial	<u>704</u>	704	96%	0.0	97%
<u>EU037282.1</u>	Kocuria sp. G3DM-46 16S ribosomal RNA gene, partial se	<u>699</u>	699	96%	0.0	96%
<u>AY211163.1</u>	Kocuria sp. 'Mali 139' 16S ribosomal RNA gene, partial se	<u>699</u>	699	96%	0.0	96%
<u>DQ448773.1</u>	Kocuria sp. CNJ787 PLO4 16S ribosomal RNA gene, partia	<u>688</u>	688	96%	0.0	96%
<u>AY211129.1</u>	Micrococcus sp. 'Mali 35' 16S ribosomal RNA gene, partia	<u>688</u>	688	96%	0.0	96%
<u>AY211126.1</u>	Kocuria sp. 'Mali 32' 16S ribosomal RNA gene, partial sec	<u>688</u>	688	96%	0.0	96%
<u>AM884578.1</u>	Uncultured Kocuria sp. partial 16S rRNA gene, clone DUR	<u>669</u>	669	95%	0.0	95%
<u>EF602041.1</u>	Kocuria flavus strain HO-9041 16S ribosomal RNA gene,	<u>664</u>	664	91%	0.0	96%
<u>EF675624.1</u>	Kocuria sp. RM13Y 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	<u>658</u>	658	96%	0.0	95%
<u>AY211187.1</u>	Kocuria sp. 'Mali 343' 16S ribosomal RNA gene, partial se	<u>632</u>	632	86%	3e-178	97%
<u>AY345428.1</u>	Bacterium K2-25 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	<u>630</u>	630	96%	1e-177	94%
<u>DQ113879.1</u>	Bacterium mbm06 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	<u>630</u>	630	96%	1e-177	94%
<u>DQ358668.1</u>	Kocuria sp. YIM DKMY51 16S ribosomal RNA gene, partia	<u>627</u>	627	96%	2e-176	93%
<u>AM900125.1</u>	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone librar	<u>627</u>	627	96%	2e-176	93%
<u>AF385532.1</u>	Kocuria sp. oral clone AW006 16S ribosomal RNA gene, f	<u>627</u>	627	96%	2e-176	93%
<u>DQ448711.1</u>	Kocuria sp. CNJ770 PLO4 16S ribosomal RNA gene, partiz	<u>625</u>	625	96%	6e-176	93%
<u>AY211178.1</u>	Kocuria sp. 'Mali 234' 16S ribosomal RNA gene, partial se	<u>625</u>	625	96%	6e-176	93%
<u>AB094467.1</u>	Kocuria sp. 2216.35.31 gene for 16S rRNA, partial sequ	<u>625</u>	625	96%	6e-176	93%
<u>DQ113896.1</u>	Bacterium mbm01 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	<u>625</u>	625	96%	6e-176	93%
<u>DQ113873.1</u>	Bacterium mbm15 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	<u>625</u>	625	96%	6e-176	93%

Lampiran IV.20. Data hasil *sequence* gen 16S rDNA dari 19 isolat bakteri lokal terpilih

>Isolat P10

TATCGTTGTGGCGTGCCTGatACATGCaCGCCGAGCGACCTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGACGTTAGCGG  
CGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACC  
GGATAACATTTTTCTTGCATAAGAGAAAATTGAAAGATGGTTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGG  
TGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGC  
CACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAA  
GTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCCGGGTCGTA AAC

>Isolat P16

GGGACGCTGGCGCGTGCCTATCTTCATTGAGCGAGCTGATTGGAAGCTTGCTTCTATGACGTTAGCGGC  
GGGCGGGTGAAGTACACGTGGGCAACCTGCCTGTACGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCG  
GATAACATTTTTCTTGCATAAGAGAAAATTGAAAGATGGTTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGG  
GCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCC  
ACACTGGTACTGAGACACGGCCACACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACTAGAG  
TCTGACAGAGCAGCGCCGCGTGAGTGATGAACGTTTTCCGAGTCTTAAACTCTGTTGTTAGGGAC

>Isolat K48

GCGCCACGCTGGCGCGTGCCTATGCTCAATGTGAGCGAGCTGATTAGAAGCTTgTTCTATgACGTTAGC  
GGCGGGCGGGTGAGTaACACGTGTGCAACCTGCCTGTACGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATA  
CCGGATAACATTTCTTGCATAAGAGAAAATTGAAAGATGGTTTTCGGCTATCACTTACTGATGGGCCCGC  
GGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCG  
GCCACACTGGGACTGAGACACgGCCAGACTCCTACGGCAGGCAGCAgTAGGGAATCTCCGCTATGTACgA  
AAGtCTGACAGAGCaaCGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCCGGTCCGACAACCTCTGTGtTAGGGAAGAAC  
ATGTACAAGATTACATGCTGG

>Isolat P43

GGTTACCTAGCTGCTTCCCTCCATTGACGCTCGTGCGTGTATTTCATGCTTGCTTCTATGACGTTAgcgGC  
gGACGGGTGAGTaCaCGTGggCACCTGcCTGTaaGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGA  
TAGGATCTTCTCCTTTCATGGGAGATGATTGaAAGATGGTTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGgtgC  
ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCaccAAGCAGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGGCATGATGATCTG  
ACGTCACTGATACTCTTCCCTCCGACTCCTACGGGAGGGTCAGTTAGAAATCTCCAGTAATGGATGAAACTA  
AAATCAAGAACTGCGCTCGAGTGATGACTTAACCCAAGTCTCAAATCTGATGTGACGGCAACAATGCTAC  
ACCTGTCACCTCCGTGTAC

>Isolat P18

CGCTGACAGTCTGCTGCAGCCATAGTCATGCaAGTcGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGC  
GGCGGAGGGTGAAGTAAACAGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATAC  
CGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGG  
GCACATtTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGGC

>Isolat S18

GGGTCCACGCGCGCGCCAGTGCCTATAACATGAGTGCAGCGGaaCAGAAGGGAGCTTGcTCCCGGATGTTAG  
CGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGgGTAacCTGCCTGTAAGACTGGGATaACTCCGGGAAACCGGAGCTAat  
ACCGGATAGTtCCTTGAACCGCATGGTTCAAGgATGaAAGACGGTTTTCCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCG  
CggCCTTaGCTAGTTGGTGAGGTAACGgCTCACCATgCGGACGATGCGTAGCCgaCCTGAGAGGGGGGCATG  
ACACATTTGGACACTCATCACCCCCTCCTACTCCTACGTCAACGGCAGTCAACTTAATCTTCCCCACTGGA  
TGCTGGTCTGACAGATCAACGGCTCGCTGAGTGATGCGGGGTTTTAACGATCGAACTGCTCAGTAGAGAGGA  
AAAAAACAAATGCAACACTTTGTTGCTCGGTCTTGA

## &gt;Isolat T17

CGCTCGAACTCATCCGGCGGAAGCTTGCCACGTGCCCGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATG  
 TTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCT  
 ATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTC AAGCATGaAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGAcc  
 GGCGGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCATgCGGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGA  
 TCATGAcGAcTgGACACTGAGACACACGTTcAGACTcCTACGGGAGGCAGGTcACCTTAAAGTGCCGAAATG  
 GAATGATGGTCACACAGATCAACGGTT

## &gt;Isolat T28

GCAACGCTGGCGGGCTGCCTATaCATGCAgTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGGC  
 GACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGG  
 ATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTC AAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGGC  
 CATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACC AAGGCACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCA  
 CACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGT  
 CTGACGGAGCAACGCCCGCTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGT  
 GCAAGAG

## &gt;Isolat T1

TGCTATCCCTGGCCGCGTGCCTCTCTCGACTTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTGTAGCGG  
 CGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACC  
 GGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTC AAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGG  
 CGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACC AAGGCACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGC  
 CACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGAcGAA  
 GTCTGACAGATCAACGCCCGCTGAGTGATGAAGTTTTTC

## &gt;Isolat P11

GGGTGACGCTGGCGGGCTGCCTATACATgCACCTCGAGCGAGCTGATTAGAAGCTTGcTTCTATGACGTTAG  
 CGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAaGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAAT  
 ACCGGATAACATTTTTCTCTGCATAAGAGAAAATTGAAAGATGGTTTTCGGCTATCACTTACAGATGGCCCG  
 CGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACC AAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATC  
 GGCCACaCTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACG  
 AGAGTCTGACgGAGCAACGCCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTAGGGAAGAA  
 CAAGTACAAGAGTAACT

## &gt;Isolat S23

CCGTGTGCTGTGTCATCGTAGCCAGTCACgTCGAGCGGaTCAaAGGGAGCTTgCTCCCTGAGATCAGCGG  
 CGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTaAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACC  
 GGATAACTCAGTTCCTCGCATGAGGAACTGTTGAAAGGTGGCTTTTGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCG  
 GCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACC AAGGCACGATGCGTAgCCGACCTGAGAGGGTGATCGG  
 CCACACTGGGACTGAgACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCATTAGGGAATCTtCCGCaGTGGACGAA  
 AGTCTGACAGAACAaCGCCCCGTGAgTGAAGAAGgTTTTCCGAATCgTCAAACCACTGTTGTGGGGAAAAA  
 CAaGTGCCGCTTGTAAG

## &gt;Isolat T18

GGCAAACCTGGCGGGCTGCCTATaCATGCATGTCGAGCGGATCTTCATTAGCTTGCTTTTGAAGATCAGCGGC  
 GGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCG  
 GATAATCCTTTCCCTCACATGAGGGAAAGCTGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGGCCCGCGGC  
 GCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACC AAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCC  
 ACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAG  
 TCTGACGGAGCAACGCCCGCTGAACGATGAAGGTTTTTCGGGTCGTAAAGTTCTGTTGTGACGG

## &gt;Isolat K52

GGACGAacgcTGGCGGCGTGCCTATacTgCCAGTCGAGCGGATCGATGGGAGCTTGCTCCCTGAGATCAGCG  
 GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATAC  
 CGGATAATTTAGTTCCCTCGCATGAGGAACTGTTGAAAGGTGGCTTTTCGCTACCACTTACAGatGGACCCCG  
 GGCgCATTAGCTAGTTGGTGGTAACGgCTCaCCAaGGCAACGATGCgTagCCgACCTGAgAGGGTGATCG  
 GCcaCACTGGGactGAGACaCGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAgTAGGGAATCTTCCGCAATGgACgA  
 AAGTCTgACGgAgCAACGCCCGGTGATTGAAGAAGGTTTTTCGgATCTAAAAACT

## &gt;Isolat P7

CGGCAACgcTGGCGGCGTGCCTATacacTgCaAGTCGAGCGGATCGATGGGAGCTTGCTCCCTGAGATCAGCG  
 GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATAC  
 CGGATAATTTAGTTCCCTCGCATGAGGAACTGTTGAAAGGTGGCTTCgGACACCACTTACAGatGGaCCCgCG  
 GCgCATTaGCTTAGTTGGTgaGGTaACgGCTTCCCCAaGGcAACgaTgCGTAGCCgACCTGAGAGGGGGATG  
 GGCcaCATTGGGACTgAgACACCGCCAgACTcCTACgGGAGGCAGCAgTAGGGAATCTtCCgCAatGGACg  
 AAAGTCTgAcgGAgCaACGCCCGGTgAGTgAAGAAgTTTTTCgGatCGTAAAAAC

## &gt;Isolat T21

CGCAAAGTCGTGCAGCTTGCTaATacTGCAAGTCGAGCGAACAGATGAGGAGCTTGCTCCTCTGACGTTAG  
 CCGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCCTTaAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAAT  
 ACCGGATAATTGAAAGAACCTCCTGGTTCTTTTaTGAAGGGCGGCTTcTGGcTGTCACTTaAGGATGGGCCC  
 gCGgCgCATTACTTAGTTGGTgAGGTAACGGCTCacCAAGGcAACgATgCGTAGCCgACCTgAgaGGGtGTA  
 TCGgcCCaTgGGAACGAAGACAGCCCCAgACTCCTACGGGagGAGGCGTAGGGAATCTTCCgCAatGGACg  
 aAAgTctGACGAGCAaCGCCCGTgaGtgaAgAagTTTTTCGGA

## &gt;Isolat T26

GGTAATCTGCAAGCTTGCTGATCTGCTCGTCGAGCGACAGATGAGGAGCTTGCTCCTCTGACGTTAGCGGC  
 GGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCCTTaAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCG  
 GATAATTGAAAGAACCTCCTGGTTCTTTTATGAAAGGGCGGCTTcTGGCTGTCACTTaAGGATGGGCCCgCGG  
 CgCaTTACTTAGTTGGTgAGGTAACGGCTCACCAAGGcAACgATGCGTAgCCgACTTAAGaGGGtGATCGGC  
 ACCCTGGGAAGTgAgACAGGgCCCgACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCCgCAATGgACGAAA  
 GTCTGACGgAGCAaCGCCGcGTGAGTgAAgAAGGTTTTTCGGATCTA

## &gt;Isolat T9

TGGTTAACGCTGGCGGCGTGCCTATaCATGCCTGTCGAGCGACTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGACGTTAG  
 CCGCGGACGGGTGAGTACACGTGGGCAACCTGCCCTGTAAGACTGGGATAACTTCCGGGAAACCGAAGCTAAT  
 ACCGGATAGGATCTTCTCCTTCATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTTCGGctaTCAcTTACAGATGGGCCCCG  
 CGACCTCATTAGCTAGTTGGTGGTAACGGCTCACCAAGGCACgAGTgCATAGCCGACCTGAgAGGGTGAT  
 CGGCCACacTGGGACTGACACATTgCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTtCCGCAATGGAC  
 GAAAGTCTGAAGGAgCaGCgCCGcGTGAGTgATGAAGGCTTTCGGGTGTAACCTCTTTTTCAGTAGGGAAGGAGC

## &gt;Isolat S9

GATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTTACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGG  
 TCTAATACTGGATATGACTTCTCATCGCATGGTGGGGGGTGGAAAGATTTATTGGTCTTGGATGGACTCGCG  
 GCCTATCAGCTTGTGGTGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTgACCCG  
 CCACACTGGGACTGAGACACGTCCcagacTcCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCA  
 AGCCTGATGCAGCGACGCCCGGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTTCAGTAGGGAAGGAGC  
 GAGAGTGACGGTACCTGCAGAAG

## &gt;Isolat T23

TGGCAACGCTGGCGGCGTGCTTACACATGCACgTCGAACGCTGaGGCTCCAGCTTGCTGGGGTGGATGAGTG  
GCGAACGGGTGAGTAATACGTGAGTAACCTGCCCTTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACCGGGTCTAATAC  
TGGATACGACGTCCTACCGCATGGTGGGGCGTGGAAAGGGTTTTACTGGTTTTGGATGGGCTCACGGCCTAT  
CAGCTTGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACgACgGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACaC  
TggaTTgagaTCACTGCCCACACTCCTACgGGAGGCAGACGTGGGGAATATtGCACAATGGGCGcAAGCCTG  
ATGCAGCgACgCCGCGTGAGGGTGACGGTCTTcGGGtTgTAaacctctttcagcagggaaaaaagctgacga  
a







## DISKUSI PARIPURNA

Aplikasi bakteri probiotik dalam budidaya udang mulai diterapkan untuk meningkatkan status kesehatan terutama dari serangan penyakit *white spot syndrome virus (WSSV)* sejalan dengan permintaan pasar internasional tentang keamanan pangan. Pembudidaya udang harus melaksanakan tiga aspek dalam pemeliharaan udangnya, yaitu aspek budidaya berkelanjutan (*sustainability*), aspek rekam jejak pembudidayaan (*traceability*) dan aspek keamanan pangan (*food safety*) (Geovanny dkk. 2007). Bakteri probiotik yang digunakan dalam budidaya udang saat ini hanya sebagai agen pencegahan (*preventive agent*), belum digunakan sebagai agen terapi (*curative agent*) (Rengpipat dkk. 2000; Verschuere dkk. 2000). Probiotik sebagai agen pencegah harus diberikan secara rutin sejak pemeliharaan udang di mulai hingga menjelang panen, yang tentunya akan meningkatkan biaya produksi pemeliharaan udang.

Meskipun aplikasi bakteri probiotik dalam akuakultur sebagai agen terapi (*curative*) belum dilaporkan, namun beberapa fakta menyatakan bahwa probiotik dapat digunakan sebagai terapi untuk kesehatan manusia dan hewan terestrial (Cunningham-Rundles dkk. 2000; Marteau dkk. 2001; Isolauri dkk. 2002; Lisal 2005). Fakta yang menunjukkan bahwa probiotik dapat digunakan sebagai agen terapi dijadikan pertimbangan untuk diterapkan juga dalam akuakultur, terutama untuk budidaya udang yang sarat modal.

Penelitian bakteri probiotik kemudian berkembang kearah pencarian isolat bakteri lokal potensial untuk mengantisipasi penyakit udang. Bakteri lokal kemungkinan besar memiliki keunggulan dibandingkan dengan bakteri non lokal (*import*) karena telah teradaptasi dengan lingkungan sekitarnya dan mudah dalam pemeliharaannya.

Tujuan penelitian adalah memperoleh isolat bakteri probiotik lokal potensial (*indigenous probiotic*) yang dapat digunakan sebagai terapi pada udang vannamei terhadap serangan WSSV. Berdasarkan hasil seleksi kemampuan terapi pada udang vannamei terhadap WSSV, telah diperoleh 19 isolat bakteri probiotik lokal terpilih yang dapat meningkatkan kesehatan udang vannamei (*Litopenaeus vannamei*). Isolat-isolat bakteri tersebut diperoleh dari empat daerah sampling yaitu: Serang, Tangerang, Karawang dan Pandeglang dan diambil dari tiga substrat yaitu: air tambak udang, sedimen/tanah tambak dan usus udang vannamei (*shrimp's gut*).

Penentuan lokasi sampling merupakan langkah pertama untuk memperoleh bakteri probiotik lokal (Verschuere dkk. 2000; Irianto 2003). Penentuan empat daerah sampling yaitu: Serang, Tangerang, Karawang dan Pandeglang didasarkan atas pertimbangan bahwa daerah tersebut merupakan penghasil perikanan dari sektor pertambakan terutama budidaya udang *penaeid* yang telah lama dioperasikan (Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya 2007). Keempat daerah sampling tersebut merupakan lokasi strategis untuk memperoleh isolat bakteri lokal potensial, dan untuk

mempelajari keragaman jenis bakteri probiotik lokal yang berada di pertambakan udang.

Hasil isolasi menunjukkan bahwa diperoleh 168 isolat bakteri lokal dari empat wilayah sampling yang terdiri dari: 24 isolat dari Serang, 46 isolat dari Tangerang, 55 isolat dari Karawang, dan 43 isolat dari Pandeglang. Isolat-isolat bakteri tersebut diambil dari tiga substrat, yaitu: air tambak udang vannamei, sedimen tambak dan usus udang (*shrimp's gut*) vannamei. Hal tersebut merujuk pendapat Irianto (2003) dan Rengpipat dkk. (2000) yang menyatakan bahwa bakteri probiotik dapat diisolasi dari beberapa macam substrat di antaranya: air pemeliharaan udang, sedimen/tanah tambak, dan saluran pencernaan udang (*shrimp's gut*).

Metode pengayaan (*enrichment*) menggunakan medium *triptic soy broth* (TSB) yang ditambahkan 2% NaCl bertujuan untuk meningkatkan populasi bakteri pada substrat, sedangkan metode gores (*streak*) (SOW 2005) dapat digunakan untuk mendapatkan isolat bakteri representatif (*single colony*) dari substrat yang peroleh. Sementara metode *gut scraping* (Lightner 1996) efektif untuk mendapatkan isolat bakteri dari saluran pencernaan udang. Seleksi berdasarkan *morphotype* (Robertson dkk. 1998) bertujuan untuk memperoleh koloni yang refresentatif yang mengindikasikan keragaman jenis bakteri yang diperoleh. Seleksi koloni dilakukan berdasarkan perbedaan warna, bentuk, permukaan, margin, dan elevasi koloni.

Seleksi isolat bakteri berdasarkan kemampuannya meningkatkan kelangsungan hidup udang merupakan tahap yang penting dalam penelitian ini. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 71 dari 136 isolat bakteri menunjukkan kemampuan meningkatkan kelangsungan hidup udang vannamei dibandingkan dengan perlakuan kontrol sebesar 80,23% (Gambar 1.3). Kemampuan meningkatkan kelangsungan hidup udang diduga karena kemampuan meningkatkan respon imunitas udang (Rengpipat dkk. 2000) dan atau kemampuan berkompetisi terhadap ruang dan nutrien (Irianto & Austin 2002). Isolat-isolat bakteri tersebut diduga menjadi imunostimulan yang kemudian memicu sistem pertahanan selular pada tubuh udang, yaitu berupa aktivitas fagositosis (Johansson dkk. 2000) oleh hemosit udang melalui sel *hyalin* dan *semi granular*, sehingga udang lebih tahan terhadap perubahan lingkungan yang terjadi di media pemeliharannya terutama akibat serangan penyakit. Udang memiliki sistem pertahanan non spesifik yang lebih berperan daripada sistem pertahanan spesifik (Sritunyalucksana & Söderhäll 2000). Salah satu di antaranya adalah aktivitas fagositosis oleh hemosit (sel darah udang). Fagositosis tersebut menjadi penting karena berperan dalam hampir semua proses pembersihan dan penghancuran mikroorganisme asing secara intraselular (Bellanti 1993).

Pada tahap uji efikasi isolat bakteri probiotik terpilih terhadap udang yang diinfeksi WSSV, diperoleh 19 isolat bakteri yang mengindikasikan kemampuan meningkatkan respon imunitas udang vannamei. Kemampuan meningkatkan respon imunitas udang ditunjukkan oleh beberapa parameter

yang diamati seperti kelangsungan hidup udang 25-58,3% dibandingkan dengan kontrol (tanpa penambahan bakteri) sebesar 8,3% (Gambar II.12), aktivitas fagositosis udang sebesar 17,7%-30% dibandingkan dengan kontrol sebesar 11% (Gambar II.13), Jumlah total hemosit sebesar 18.000 - 29.000 ribu sel/mm<sup>3</sup> dibandingkan dengan kontrol 11.300 sel/mm<sup>3</sup> (Gambar II.14), dan tidak terjadi kerusakan jaringan organ insang (Gambar II.16) dan hepatopankreas udang (Gambar II.17) pada visualisasi histopatologi dibandingkan dengan kontrol.

Meningkatnya kemampuan aktivitas fagositosis udang kemungkinan berkontribusi dalam menghilangkan WSSV dari udang yang terinfeksi WSSV. Aktivitas fagositosis udang memegang peranan penting dan menjadi mekanisme pertahanan utama dalam sistem pertahanan selular pada udang. Fagositosis, melalui sel *hyalin* dan semi granular merupakan media penangkapan partikel asing atau partikel lainnya oleh sel tubuh. Partikel asing ditangkap oleh sirkulasi hemosit dan dihambat dalam nodul hemosit atau enkapsulasi dengan membentuk beberapa lapisan sel (Alday-sanz 1995). Sembilan belas isolat bakteri probiotik pada udang terinfeksi WSSV mampu menghilangkan WSSV pada udang vannamei setelah diterapi dengan isolat bakteri probiotik yang ditunjukkan dengan deteksi negatif WSSV pada udang melalui pengujian dengan metode PCR dibandingkan dengan kontrol. Faktor lain yang diduga berkontribusi menghilangkan WSSV pada udang vannamei setelah diterapi dengan isolat bakteri probiotik yang ditunjukkan dengan deteksi negatif WSSV pada udang melalui pengujian

dengan metode PCR dibandingkan dengan kontrol adalah faktor kompetisi. Sembilan belas isolat bakteri kemungkinan mampu berkompetisi ruang dengan WSSV pada udang vannamei.

Hasil penelitian membuktikan bahwa bakteri probiotik lokal dapat digunakan sebagai agen terapi terhadap udang yang terinfeksi WSSV, seperti halnya yang sudah diterapkan pada manusia, dan mamalia besar, seperti gangguan saluran pencernaan (*gastrointestinal disturbances*) dan HIV (Marteau dkk. 2001; Isolauni dkk. 2002; Cunningham-Rundles dkk. 2000; Lisal 2005). Hasil tersebut di atas merupakan suatu inovasi dari penelitian ini. Selama ini aplikasi probiotik pada udang lebih terfokus pada aplikasi sebagai pencegahan (*prophylactic*).

Pada uji efikasi menggunakan *Artemia* sebagai organisme tingkat tropik berbeda dari udang, 19 belas isolat terpilih tidak menunjukkan efek negatif terhadap persentase penetasan kista *A. salina* (Gambar III.1) yang merupakan pakan hidup (*live food*) pada pembenihan udang penaeid (Laven & Sorgeloos 2000). Hal tersebut dapat dilihat dari persentase penetasan secara statistik sama ( $p > 0,05$ ) dengan kontrol (tanpa penambahan kandidat probiotik) yaitu  $\pm 85\%$ .

Isolat-isolat bakteri lokal terpilih mampu menekan populasi bakteri *Vibrio* sp. yang merupakan bakteri oportunistik (Verdonck dkk. 1991) pada udang baik pada pembenihan di *hatchery* maupun pada pembesaran di tambak yang dapat menimbulkan kematian pada udang. Berdasarkan hasil penelitian pada tahap ini dapat direkomendasikan bahwa aplikasi bakteri

probiotik diterapkan secara komprehensif, yaitu dari kegiatan pembenihan udang di *hatchery* hingga kegiatan pembesaran udang di tambak.

Hasil identifikasi 19 isolat bakteri probiotik berdasarkan data *sequence* gen 16S *ribosomal* RNA, menggunakan *Automated DNA Sequencer* menunjukkan semua isolat termasuk dalam kelompok bakteri Gram positif (Gambar IV.2). Isolat bakteri lokal terpilih tersebut diwakili oleh *Bacillus subtilis* (1), *Bacillus pumilus* (5), *Bacillus megaterium* (1), *Bacillus flexus* (3), *Bacillus* sp. (7), *Micrococcus* sp. (1), dan *Micrococcus luteus* (1).

Isolat bakteri lokal terpilih berasal dari kelompok bakteri Gram positif (G+) yaitu genus *Bacillus* 17 isolat dan genus *Micrococcus* 2 isolat dari 19 isolat terpilih hasil seleksi. Kedua genus tersebut sangat berpotensi untuk dikembangkan sebagai bakteri probiotik lokal. Hal tersebut disebabkan genus *Bacillus* dan *Micrococcus* memiliki karakter toleransi yang baik terhadap panas, derajat keasaman dan kadar garam. Karakteristik tersebut akan sangat memudahkan dalam pemeliharaan dan penyimpanan isolat bakteri untuk periode waktu lama (Irianto 2003; Feliatra dkk. 2004) yang merupakan salah satu persyaratan dasar dari bakteri probiotik.

Bakteri Gram positif banyak digunakan sebagai bakteri probiotik dalam akuakultur. Bakteri Gram positif merupakan bakteri kosmopolit (ditemukan dimana-mana), sehingga mendominasi populasi bakteri di alam. Bakteri Gram positif juga memiliki karakter morfologi lebih baik dibandingkan dengan Gram negatif. Bakteri Gram positif memiliki dinding sel lebih tebal, yaitu 15-50 nm dibandingkan dengan Gram negatif yang hanya 2 nm (Verschuere

dkk. 2000), bahkan *Bacillus* memiliki kemampuan membentuk spora (Holt dkk. 1994) sehingga bakteri Gram positif diduga lebih dapat bertahan terhadap perubahan lingkungan.

Dua dari tujuh spesies bakteri yang diperoleh yaitu *Bacillus subtilis* (Sorokulova dkk. 2007) dan *Bacillus pumilus* (Duc dkk. 2004) dinyatakan masuk dalam kategori *generally recognized as safe* (GRAS), sedangkan spesies lainnya, meskipun belum masuk dalam kategori GRAS, tetapi diketahui tidak bersifat patogenik oportunistik atau penghasil toksin kecuali *Bacillus anthracis* (Holt dkk. 1994) yang bersifat patogen terhadap hewan (Ka Yin 2004).

Meskipun beberapa spesies *Bacillus* sudah dianggap GRAS, akan tetapi kemampuan *Bacillus* menghasilkan spora sering dikhawatirkan keamanannya apabila dikonsumsi oleh manusia. Duc dkk. (2004) menyatakan bahwa spora yang dihasilkan oleh *Bacillus* tidak menimbulkan dampak buruk dalam saluran pencernaan inang, bahkan germinasi dari spora dapat menghasilkan senyawa antimikroba, yaitu bahan penghambat seperti *bacteriocin* (*bacteriocin-like inhibitory substances*).

Duc dkk. (2004) menyatakan, bahwa diduga spora akan berinteraksi dengan *gut-associated lymphoid tissue* (GALT) karena spora tersebut akan bergerminasi di dalam saluran pencernaan inang. Hasil penelitian Duc dkk. (2004) pada tikus, menunjukkan bahwa spora yang termakan menunjukkan sifat imunogenik dan dapat terdistribusi ke the *Peyer's patches* dan



*mesenteric lymph nodes* (MLN) yang merupakan bagian *gastrointestinal tract* sehingga dapat meningkatkan efektivitas dari probiotik.

Pada penerapan probiotik di lapangan (pertambakan udang) perlu diperhatikan dua faktor yaitu faktor *deterministic* dan *stochastic*. Faktor *deterministic* adalah faktor-faktor yang berkaitan dengan besaran dan respon yang ditimbulkan seperti konsentrasi bakteri yang digunakan. Faktor *stochastic* adalah faktor *waktu* dan *tempat* yang tepat bagi bakteri untuk masuk ke dalam suatu habitat tertentu agar dapat menjalankan perannya (Verschuere dkk. 2000). Pada skala laboratorium 19 belas isolat bakteri lokal terpilih mampu memenuhi kedua aspek penentu (*deterministic* dan *stochastic*) tersebut, sehingga menunjukkan hasil lebih baik dibandingkan dengan perlakuan kontrol (tanpa pemberian kandidat probiotik) terhadap beberapa parameter yang diuji saat penelitian dilakukan, sedangkan pada skala lapangan belum diketahui kemampuannya. Oleh karena itu perlu dilakukan pengujian pemberian isolat bakteri probiotik lokal pada skala lapangan.



**KESIMPULAN UMUM DAN REKOMENDASI**

## KESIMPULAN DAN REKOMENDASI

Dari rangkaian penelitian dan hasil yang diperoleh, maka dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Sebanyak 136 isolat bakteri diperoleh dari tiga jenis substrat (air, sedimen dan usus udang *L. vannamei*) dari empat lokasi sampling (Serang, Tangerang, Karawang dan Panimbang). Tujuh puluh satu dari 136 isolat bakteri mampu meningkatkan kelangsungan hidup udang vannamei.
2. Berdasarkan hasil seleksi berdasarkan kemampuan terapi terhadap WSSV, diperoleh 19 isolat bakteri probiotik lokal potensial. Isolat-isolat bakteri tersebut meningkatkan kelangsungan hidup udang, meningkatkan indeks imunitas udang, dan menunjukkan visualisasi histologi insang dan hepatopankreas udang lebih baik dibandingkan kontrol. Penambahan isolat bakteri probiotik pada udang terinfeksi WSSV, mampu menghilangkan WSSV pada udang vannamei setelah diterapi dengan isolat bakteri probiotik yang ditunjukkan dengan deteksi negatif WSSV berdasarkan pengujian menggunakan metode PCR.
3. Hasil pengujian pengaruh penambahan isolat bakteri probiotik terhadap persentase penetasan kista *A. salina*, menunjukkan 19 isolat bakteri probiotik terpilih tidak menurunkan persentase

penetasan kista *A. salina* dan mampu menekan pertumbuhan bakteri *Vibrio* sp.

4. Hasil identifikasi 19 isolat bakteri berdasarkan data *sequence* gen 16S ribosomal RNA menunjukkan bahwa seluruh isolat termasuk dalam Gram positif yang terdiri dari dua genera yaitu: *Bacillus* (17) dan *Micrococcus* (2). Spesies dari genus *Bacillus* yaitu: *Bacillus flexus* (3), *Bacillus megaterium* (1), *Bacillus pumilus* (5), *Bacillus subtilis* (1), dan *Bacillus* spp. (7), sedangkan spesies dari genus *Micrococcus* yaitu: *Micrococcus luteus* (1), dan *Micrococcus* sp. (1).

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat direkomendasikan beberapa hal sebagai berikut:

1. Bakteri probiotik lokal dapat digunakan sebagai agen terapi udang vannamei yang terinfeksi WSSV.
2. Aplikasi probiotik sebaiknya dilakukan pada saat penetasan kista *Artemia* di unit pembenihan udang.

Saran-saran untuk melengkapi penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Pengujian pemberian isolat bakteri probiotik lokal pada skala lapangan di unit budidaya udang vannamei.
2. Perlu dilakukan pengujian bentuk aplikasi bakteri probiotik (bentuk cair, tablet atau dicampur dengan pakan), dosis bakteri yang digunakan dan komposisi bakteri probiotik.



**DAFTAR ACUAN**

## DAFTAR ACUAN

- Ajitha, S., M.Sridhar, N. Sridhar, I.S.B. Singh & V. Varghese. 2004. Probiotic effect of Lactic Acid Bacteria against *Vibrio alginolyticus* in *Penaeus* (Fenneropenaeus) *indicus* (H.Milne Edwards). *Asian Fisheries Science*. 17:71-80.
- Angert, E.R., D.E. Northup, A.L.Reysenbach, A.S.Peek, B. M. Goebel, & N. R. Pace. 1998. Molecular phylogenetic analysis of a bacterial community in Sulphur River, Parker Cave, Kentucky. *American Mineralogist*. 83:1583-1592.
- Atmomarsono, M., Muliani & M. I. Madeali. 2004. Pengaruh jenis pakan dan konsentrasi vitamin C terhadap sintasan pascalarva udang windu yang dipapar dengan *white spot syndrome virus* (WSSV). *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*. 1(10):41-46.
- Apostolou, E., P.V.Kirjavainen, M. Saxelin, H. Rautelin, V. Valtonen, S.J. Salminen & A.C. Ouwehand. 2001. Good adhesion properties of probiotic: a potential risk for bacteremia?. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 31:35-39.
- Balcázar, J.L., I.de Blas, I.R.Zarzuela, D. Cunningham, D. Vendrell, & J.L. Múszquiz. 2006. The role of probiotic in aquaculture. *Veterinary Microbiology*. 114:173-186.
- Boyd, C.E. 1998. *Water quality management for pond fish culture*. Elsevier. Alabama. 318 hlm.
- Brock, J. A. & K.L. Main. 1994. *A guide to the common problems and diseases of cultured Penaeus vannamei*. World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana, USA.78 hlm.
- Chan, T.Y. 2000. *Shrimps and Prawns*. FAO identification for Fish, Shrimps etc. Annually Report. 65 hlm.
- Chang, C.F., Su MS, H.Y. Chen, C.F. Lo, G.H. Kou & I.C. Liao . 1999. Effect of Dietary Beta-1,3-glucan on Resistance to White Spot Syndrome Virus (WSSV) in Post larval and Juvenile *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Org*. 36:163-168.
- Cholik, F., A.G. Jagatraya & R. P. Poernomo, A.Jauzi. 2005. *Akuakultur; Tumpuan harapan masa depan bangsa*. MPM. TAAT-TMII. 415. hlm.

- Cowan, S. T. 1974. *Manual for the identification of medical bacteria*. Cambridge University Press. London Second edition. 229 hlm.
- Crane, J. 2002. Pro and anti: The biotic of allergic disease. *Thorax*. 57(suppl II):ii40-ii46.
- Cunningham-Rundles, S., S. Ahrne, S. Bengmark, R. Johann-Liang, F. Marshall, L. Metakis, C. Califano, A.M. Dunn, C. Grasse, G. Hinds, & J. Cervia. 2000. Probiotics and immune response. *The American Journal of Gastroenterology*. 1(95):S23-S25.
- De Vrese, M., & P. R. Marteau. 2007. Probiotics and prebiotics: Effects on diarrhea. *The Journal of Nutrition*. 137:803S-811S.
- Dinkci, N., G. Unal, S. Alkalin & S. Gonc. 2006. The importance of probiotic in pediatrics. *Pakistan Journal of Nutrition*. 5(6):608-611.
- Direktorat Jenderal Perikanan. 1987. *Petunjuk bagi pengoperasian unit usaha pembenihan (hatchery) udang windu*. Infis manual. 101 hlm.
- Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya. 2004. *Petunjuk Teknis Percontohan Budidaya udang*. Departemen Kelautan dan Perikanan. 24 hlm.
- Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya. 2008. *Statistik Perikanan Budidaya Indonesia, 2007*. Departemen Kelautan dan Perikanan. No. 8. 130 hlm.
- Doulillet, P.A. 2000. Bacterial additives that consistently enhance Rotifer growth under synxenic culture conditions; 2. Use of single and multiple bacterial probiotics. *Aquaculture*. 182:241-248.
- FAO FishStat Plus. 2007. Food and Agriculture Organization of the United Nation. Fisheries Department Statistical Database and Software, Version 2.30. [Http://www.fao.org](http://www.fao.org), accessed December, 2007.
- Fegan, D.F. 1999. *Diagnosis of shrimp diseases: with emphasis on black tiger shrimp (Penaeus monodon)*. FAO Multimedia Asia Co. LTD.
- Feliatra, Efendi & I., Suryadi, E. 2004. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Probiotik dari Ikan Kerapu Macan (*Ephinephelus fuscoguttatus*) dalam Upaya Efisiensi Pakan Ikan. *Natur Indonesia*. 6(2):75-80(2004).
- Gatesoupe, F.J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. A review. *Aquaculture*. 180:147-165.

- Geovanny, G.R.D., B.J. Luis & M.A Shen. 2007. Probiotic as control agents in aquaculture. Review. *Oceanic and coastal sea research*. 1(6);76-79.
- Gordon-Vine, N. 2004. *Towards the development of a protocol for the selection of probiotics in marine fish larviculture*. A thesis submitted in fulfillment of the requirement for the degree of Doctor of Philosophy. Faculty of Science, Rhodes University. 231 hlm.
- Gordon, S. 2008. *Freeze-dried formula may block HIV virus in breast milk*. [Http://www.MedicineNet.com](http://www.MedicineNet.com). 10 September, 2008. pukul 20.00 WIB.
- Gullian, M., F. Thompson, J. Rodriguez. 2004. Selection of Probiotic Bacteria and Study of their Immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. 233:1-14.
- Gram, L., J. Melchiorson, B. Spanggaard, I. Huber, & T.F. Nielsen. 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:969-973.
- Holmes, S. 2003. Bootstrapping phylogenetic trees: theory and methods. *Statistical Science*. 18:241-255.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley & S.T. William. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams and Wilkins, Ninth edition. Baltimore, Maryland, USA. 754 hlm.
- Isolauri, E., P.V. Kirjavainen & S. Salminen. 2002. Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation?. *Gut*. 50(supplIII):iii54-iii59.
- Johansson, M. W., P. Keyser, K. Sritunyalucksana & K. Söderhäll. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*. 191:45-52
- Kimura, T., K. Yamano, H. Nakano, K. Momoyama, M. Hiraoka & K. Inouye. 1996. Detection of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) by PCR. *Fish Pathology*. 31(2):93-98.
- Laven, P. & P. Sorgeloos. P. 2000. The history, present and prospect of the availability of *Artemia* cysts for *Aquaculture*. 181:397-403.
- Lightner, D. V. 1993. Diseases of cultured penaeid shrimp. In: McVey, J. P. (editor). Handbook of mari-culture. *Crustacean aquaculture*. 1:289-377.



- Lightner, D.V. (Ed) 1996. *A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.
- Lisal, J. S. 2005. Konsep probiotik dan prebiotik untuk modulasi mikrobiota usus besar. *J. Med. Nus.* 4(26):256-262.
- Le Moullac, G. & P. Haffner. 2000. Environmental factors affecting immune responses in crustacean. *Aquaculture*. 191:121-131.
- Lo, C.F., J.H. Leu, C.H. Ho, C.H. Chen, S.E. Peng, Y.T. Chen, C.M. Chou, P.Y. Yeh, C.J. Huang, H.Y. Chou, C.H. Wang & G.H. Kou. 1996. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Disease of Aquatic Organisms*. 25:133-141.
- Macrae, A. 2000. The use of 16S rDNA Methods in Soil Microbial Ecology. *Brazilian Journal of Microbiology*. 31:77-82.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko & J. Parker. 2000. *Brock, biology of microorganisms*. Ninth edition. Prentice Hall International, Inc. Southern Illinois University Carbondale. 991 hlm.
- Magbanua, Fe. O., K.T Natividad, V.P Migo, C.G. Alfafara, F.O.de la Oena, R.O. Miranda, J. D. Albaladejo, E. C. B. Nadala Jr, P.C.Loh & L.M Tapay. 2000. White spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* in the Philippines. *Dis Aquat Org.* 42:77-82.
- Marteau, P. R., M. De Vrase, C. J. Cellier, and J. Schrezenmeir. 2001. Protection from gastrointestinal disease with the use of probiotics. *Am. J. Nutr.*73(suppl):430S-6S.
- Mc Clennen, C. 2004. *White spot syndrome virus; the economic, environmental and technical implications on the development of latin american shrimp farming*. Master of Art Thesis. Tuft University. 106 hlm.
- Merchie, G. 1996. Use of nauplii and meta-nauplii. In: Lavens, P & Sorgeloos. P (Eds). 1996. Manual on production and use of live food for aquaculture. FAO. *Fisheries Technical Paper*. 361:107-137.
- Moriarty, D. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture*. 164:351-358.

- Munro, P. D., A. Barbour, & T. H. Birkbeck. 1995. Comparison of the growth and survival of larval turbot in the absence of culturable bacteria with those in the presence of *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, or a marine *Aeromonas* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:4425–4428.
- Namikoshi, A., J.L.Wua, T.Yamashitaa, T. Nishizawab, T. Nishiokac, M. Arimoto, & K. Murogaa, 2004. Vaccination trials with *Penaeus japonicus* to induce resistance to white spot syndrome virus. *Aquaculture.* **229**:25–35.
- Nilsson, W. B. & M. S. Strom. 2002. Detection and identification of bacterial pathogens of fish in kidney tissue using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16SRNA genes. *Dis Aquat Org.* **48**:175–185.
- OIE. 2005. Manual diagnostic tests of aquatic animals 2003. <http://www.oie.int/>. 16 juni 2005. pukul 11.00 WIB.
- Okamoto, T., K. Fujioka & T. Naganuma. 2001. Phylogenetic similarity of aerobic gram-negative halophilic bacteria from a deep-sea hydrothermal mound and Antarctic habitats. *Polar Biosci.* **14**:1–9.
- Raa, J. 1998. The use of immunostimulatory substances in fish & shellfish feed. *Rev. Fish. Sc.* **4**:229–288. in T.W. Flegel (ed). *Advanced in shrimps biotechnology. Proceedings to the special session on shrimp biotechnology 5<sup>th</sup> Asian Fisheries Forum Cheingmai, Thailand.*
- Rengpipat, S., W. Phianphak, S. Piyatiratitivorakul, & P. Menasveta. 1998. Effects of a Probiotic Bacterium on Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon* Survival and Growth. *Aquaculture.* **167**:301–313.
- Rengpipat, S., S. Rukpratanporn., S. Piyatiratitivorakul, & P. Menasveta. 2000. Immunity enhancement in Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus S11*). *Aquaculture.* **191**:271–288.
- Rengpipat, S., A. Tunyanun., A.W.Fast., S.Piyatiratitivorakul, & P. Menasveta. 2003. Enhanced growth and resistance to *Vibrio* challenge in pond-reared black tiger shrimp *Penaeus monodon* fed a *Bacillus* probiotic. *Dis Aquat Org.* **55**:169–173.
- Reeve, M.R. 1963. The filter feeding of *Artemia* in suspension of various particles. *J. experimental biology.* **40**:207–214.

- Rodríguez, J., Y. Espinosa, F. Echeverría, G. Cardenas, R. Roman & S. Stern. 2007. Exposure to probiotic and  $\beta$ -1,3/1,6-glucans in larviculture modifies the immune response of *Penaeus vannamei* juveniles and both the survival to white spot syndrome virus challenge and pond culture. *Aquaculture*. **273**:405-415.
- Saitou, N. & M. Nei. 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol Evol.* **4**:406-425.
- Sahul-Hameed, A.S., K.H.Rahaman, A. Alagan & K.Yoganandhan. 2003. Antibiotic resistance in bacteria isolated from hatchery-reared larvae and post-larvae of *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*. **217**:39-48.
- Schnieszko, S.F. 1974. The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *Journal of Fish Biology*. **6**:197-2008.
- Sorgeloos, P. 1979. The brine shrimp, *Artemia salina*: a bottleneck in mariculture, in: FAO technical conference on aquaculture. 321-324. G., P. Sorgeloos, O. Roel and Jaspers. (Eds). The brine shrimp *Artemia*. Ecology, culturing, use in aquaculture. *Universe Press. Wetteren, Belgium*. **3**:26-46.
- Subasinghe, R., & J.R. Arthur. 1997. Introducing AAPQIS: the FAO's aquaculture animal pathogen and quarantine information system *in The FAO aquaculture newsletter*. **16**:3-6.
- Sugama, K., Haryanti, & S. Tsumura. 1998. Use of By-9 as a probiotic agent in the larval rearing of *Penaeus monodon*. In Flegel TW (ed). *Advances in shrimp biotechnology*. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok. 65 hlm.
- Tirola, M., E. T. Valtonen, P. R. Kinnunen & M. S. Kulomaa. 2002. diagnosis of flavobacteriosis by direct amplification of rRNA genes. *Dis Aquat Org.* **51**:93-100.
- Van de Braak, K. 2002. *Haemocytic defense in black tiger shrimp (Penaeus monodon)*. Ph.D. thesis, Wageningen University – with ref. – with summary in Dutch. Wageningen, The Netherlands. 159 hlm.
- Vanhaecke, P & P. Sorgeloos. 1980. International study on *Artemia* XXXII: Combined effect of temperature and salinity on survival of *Artemia* of various geographical origins. *J. exp. Mar.Bio.Ecol.* **80**:259-275.

- Van Stappen, G. *Artemia*. In: Lavens, P & Sorgeloos, P (eds). 1996. Manual on production and use of live food for aquaculture. FAO. *Fisheries Technical Paper*. 361:107-137.
- Verschuere, L., G. Robaut, P. Sorgeloos & W. Verstraete. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Reviews. *Microbiology and Molecular Biology*. 64(4):655-671.
- Yoshida, R., M. Kaku, S. Kohno, K. Ishida, R. Mizukane, H. Takemura, H. Tanaka, T. Usui, K. Tomono, H. Koga & K. Hara. 1995. Trends in Antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* in Japan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 5(39):1196-1198.
- Witteveldt, J. 2006. *On the vaccination of shrimp against white spot syndrome virus*. PhD Thesis. Wageningen University. The Netherlands. 215 hlm.
- Ziaei-Nezad, S., M. H. Rezaei, G. A. Takami, D. L. Lovett, A.R. Mirvaghefi, & M. Shakouri. 2005. The effect of *Bacillus* spp. Bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. Elsevier. B.V. *Aquaculture*. 116:53-69.