Hayati, Maret 2003, hlm. 6-11 Vol. 10, No. 1
ISSN 0854-8587

Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asal Laut Sulawesi untuk Biokontrol Penyakit Vibriosis pada Larva Udang Windu (*Penaeus monodon* Fab.)

Isolation and Characterization of Marine Bacteria from Sulawesi Sea for Biocontrol of Vibriosis in Tiger Shrimp Larvae (Penaeus monodon Fab.)

MULIANI[1‡], ANTONIUS SUWANTO[1*], YUSMINAH HALA[2]

[1]*Jurusan Biologi, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Bogor 16144*
[2]*Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Negeri Makassar, Jalan Andi Pengerang Pettarani, Makassar*

Diterima 1 April 2002/Disetujui 8 Oktober 2002

Six-hundred and three isolates of marine bacteria have been isolated from Sulawesi Sea and analysed for their inhibitory effects toward *Vibrio harveyi* both *in vitro* and *in vivo* experiments. Fifteen isolates demonstrated vibriostatic activity of which BL542 had the highest activity. Physiological and biochemical characterization of the 15 isolates showed that all of them were gram negative, indole negative and amylase positive; 14 isolates were short-rod and one isolate was long-orod, 14 isolates were non motile and one isolate was motile; and 11 isolates were catalase negative and 4 isolates were catalase positive. The biocontrol candidate bacteria, at concentration of 10^8 CFU/ml, were not pathogenic to shrimp larvae at stages PL21 or PL7. BL542 had a higher inhibitory effect than BL546 or BL548 isolates on *V. harveyi* colonization both in the rearing water and shrimp larvae. Based on 16S-rRNA sequencing, BL542 isolat was closely related to DNA sequence of *Pseudoalteromonas* sp. Edeep-1 16S-rRNA.

PENDAHULUAN

Budi daya udang windu (*Penaeus monodon*) di Indonesia telah dilakukan sejak tahun 70-an dan sampai sekarang masih merupakan salah satu kegiatan perikanan yang cukup potensial. Puncak perkembangan usaha budidaya udang windu terjadi pada awal tahun 90-an dan pada periode tersebut peningkatan usaha budidaya udang windu bukan hanya melalui intensifikasi, tetapi juga pembukaan areal hutan bakau menjadi lahan pertambakan. Konsekuensi dari peningkatan usaha budi daya udang tersebut adalah kualitas lingkungan menurun yang menyebabkan timbul berbagai serangan penyakit udang. Salah satu penyakit udang yang disebabkan oleh bakteri *Vibrio*, yaitu *V. harvey*, disebut penyakit vibriosis.

Berbagai penelitian telah dilakukan untuk mendapatkan metode pencegahan dan penanggulangan penyakit pada udang windu, antara lain penggunaan antibiotik (Chanratchakool *et al*. 1995), pengelolaan limbah budi daya udang menggunakan tandon dan biofilter (Muliani *et al.* 1998a), merangsang kekebalan nonspesifik udang melalui penggunaan vaksin dan imunostimulan (Devaraja *et al*. 1998), penggunaan bahan aktif sponge dan hydrozoan sebagai antibakteri (Muliani *et al*. 1998b, dan Suryati *et al*. 2000), dan penggunaan biokontrol (Tjahjadi *et al*. 1994, Rosa *et al*. 1997, Rengpipat *et al*. 1998, Hala 1999, Haryanti *et al*. 2000a, Haryanti *et al*. 2000b).

Dari berbagai usaha tersebut, penggunaan biokontrol merupakan prospek yang menjanjikan karena lebih ramah lingkungan dan berkelanjutan. Meskipun demikian, dalam penerapannya, kebanyakan efektifitas biokontrol dan probiotik cenderung tidak konsisten. Oleh karena itu perlu penelitian untuk mencari bakteri biokontrol dan prosedur penerapan yang efektif serta konsisten dalam menanggulangi penyakit vibriosis pada udang windu.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan sejumlah isolat bakteri asal laut yang dapat menghambat pertumbuhan atau mengurangi virulensi *V. harveyi* penyebab vibriosis pada larva udang windu.

BAHAN DAN METODE

Isolasi Bakteri Laut sebagai Kandidat Biokontrol. Bakteri kandidat biokontrol diisolasi dari karang, air laut dan sedimen pantai di Makassar, Pulau Lae-Lae, Pulau Kayangan, Pulau Barang Lompo, Pulau Barang Caddi, Pulau Balam Lompo, Pulau Balam Caddi, Siddo, Bojo, Pare-Pare, Polmas, Wajo, dan Bone, menggunakan media SWC 100% (air laut 750 ml, akuades 250 ml, bakto pepton 5 g, ekstrak khamir 1 g, gliserol 3 ml, dan bakto agar 15 g), dan SWC 10% (air

‡ Alamat kini: Balai Penelitian Perikanan Pantai, Jalan Makmur Dg. Sitakka, Maros 90512, Sulawesi Selatan
* Penulis untuk korespondensi, Tel./Fax. +62-251-315107, E-mail: asuwanto@indo.net.id

laut 750 ml, akuades 250 ml, bakto pepton 0.5 g, ekstrak khamir 0.1 g, gliserol 3 ml, dan bakto agar 15 g). Morfologi isolat bakteri diidentifikasi menggunakan prosedur mikrobiologi standar (Hadioetomo 1993).

Uji Daya Hambat Bakteri Kandidat Biokontrol terhadap *V. harveyi*. Bakteri penyebab vibriosis, *V. harveyi* MR5339 ditumbuhkan pada medium TCBSA (*Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar*) selama 24 jam. Koloni tunggal yang tumbuh diambil dengan jarum Ose dan disuspensikan dalam larutan garam fisiologis (0.85% (w/v) NaCl), kemudian disebar pada media SWC dalam cawan petri, selanjutnya diletakkan piringan kertas steril berdiameter 7 mm. Piring kertas ditetesi dengan biakan bakteri kandidat biokonrol 10-20 µl (konsentrasi biakan dalam suspensi sekitar 10^8-10^9 sel/ml), dan diinkubasi pada suhu 28°C selama 24 jam. Zona hambatan yang terbentuk diukur dengan penggaris pada tiga posisi dan selanjutnya dirata-ratakan.

Karakterisasi Bakteri Kandidat Biokontrol dan Uji Sensitifitas terhadap Antibiotik. Karakterisasi fisiologi bakteri kandidat biokontrol yang dilakukan adalah pewarnaan gram, oksidase, katalase, indol, motilitas, dan aktifitas amilolitik (Muir 1996). Sedangkan uji sensitifitas terhadap antibiotik dilakukan dengan menggunakan gentamisin, kloramfenikol, eritromisin, furazolidon, dan rifampisin (DIFCO) dengan konsentrasi 25 µg/ml.

Uji Patogenisitas Bakteri Kandidat Biokontrol terhadap Larva Udang. Enam isolat bakteri laut yang potensial menghambat *V. harveyi* MR5339 selanjutnya diuji patogenisitasnya terhadap larva udang windu PL 7 dengan metode perendaman (Hameed 1995). Konsentrasi *V. harveyi* MR5339 dalam wadah pemeliharaan dibuat menjadi 10^8 sel/ml (Hala 1999) dengan menggunakan rumus pengenceran: N1V1=N2V2 (N1 = konsentrasi *V. harveyi* MR5339 dalam media SWC kaldu, V1 = volume suspensi *V. harveyi* MR5339 yang dibutuhkan, N2 = konsentrasi *V. harveyi* MR5339 yang dikehendaki (10^8 sel/ml), dan V2 = volume media air dalam wadah pemeliharaan larva udang windu). Pemberian suspensi *V. harveyi* MR5339 kedalam wadah pemeliharaan larva udang windu dilakukan menggunakan pipet skala. Volume *V. harveyi* MR5339 yang diinokulasikan ke dalam setiap wadah bergantung pada kepadatan sel *V. harveyi* MR5339 dalam media SWC kaldu.

Wadah yang digunakan adalah akuarium kaca berkapasitas 3 l yang diisi sebanyak 2 l air laut steril dengan kadar garam 28 ppt dan ditebari dengan larva udang sebanyak 20 ekor/wadah. Untuk menjaga ketersediaan oksigen, Wadah pemeliharaan larva dilengkapi dengan aerasi yang berasal dari blower. Suhu ruangan tempat penelitian berkisar antara 29-30°C. Pemberian pakan (merek Charoen Phokphand) dilakukan dua kali per hari sebanyak 10% bobot tubuh larva udang. Patogenisitas bakteri kandidat biokontrol diamati melalui kematian larva udang setelah 24 jam perendaman (Rengpipat *et al*. 1998) dan dibandingkan dengan kontrol (tanpa pemberian bakteri). Penelitian dilakukan dengan rancangan acak lengkap dengan tiga ulangan.

Uji Tantang Bakteri *V. harveyi* dengan Bakteri Kandidat Biokontrol. Uji tantang secara *in vitro* dilakukan menggunakan media kaldu SWC dalam labu erlemeyer. Kepadatan bakteri *V. harveyi* MR5339 dibuat menjadi 10^7 sel/ml (hasil uji pendahuluan menunjukkan *V. harveyi* MR5339 bersifat patogen pada kepadatan 10^7 sel/ml, dan Rengpipat *et al*. 1998) dan kepadatan bakteri penantang (BL542, BL546, dan BL548) adalah 10^8 sel/ml (hasil uji pendahuluan kepadatan bakteri BL542, BL546, dan BL548 dibawah 10^8 sel/ml tidak efektif menurunkan populasi *V. harveyi* MR5339 dan Hala 1999). Populasi *V. harveyi* MR5339 dalam wadah diamati pada hari ke 1, 2, 3, dan 4. Penelitian dilakukan menggunakan rancangan acak lengkap dengan tiga ulangan.

Uji tantang secara *in vivo* dilakukan dalam akuarium kaca berkapasitas 3 l yang diisi sebanyak 2 l air laut steril dengan kadar garam 28 ppt, dan ditebari larva udang stadia PL7 sebanyak 20 ekor/wadah. Penelitian ini terdiri atas 5 perlakuan, yaitu larva udang dibubuhi *V. harveyi* MR5339 yang masing-masing diinokulasi bersama (ditantang) dengan bakteri isolat BL542, isolat BL546, isolat BL548; kontrol positif (MR5339 tanpa koinokulasi bakteri penantang), dan kontrol negatif (larva udang yang tidak diinokulasi bakteri). Pengamatan larva udang yang mati dalam tiap wadah pemeliharaan dilakukan setiap 3 jam, sedangkan pengamatan populasi *V. harveyi* MR5339 dan bakteri biokontrol dalam air pemeliharaan larva udang dilakukan setiap 12 jam (Hala 1999). Data populasi *V. harveyi* MR5339 dan bakteri biokontrol baik yang ada dalam air pemeliharaan maupun yang mengkolonisasi larva udang, serta kelangsungan hidup larva udang dianalisis ragamnya dan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil.

Identifikasi Bakteri Kandidat Biokontrol. Isolat bakteri BL542 yang potensial menghambat *V. harveyi* diidentifikasi berdasarkan sekuen 16S-rRNA dengan metode yang dilaporkan oleh Marchesi *et al*. (1998) dan telah dimodifikasi oleh Suwanto *et al.* (2000) dalam proses ekstraksi DNA, amplifikasi gen penyandi 16S-rRNA, dan mensekuen DNA. Selanjutnya dibuat pohon filogenetiknya dari data hasil analisis FASTA sekuen DNA.

HASIL

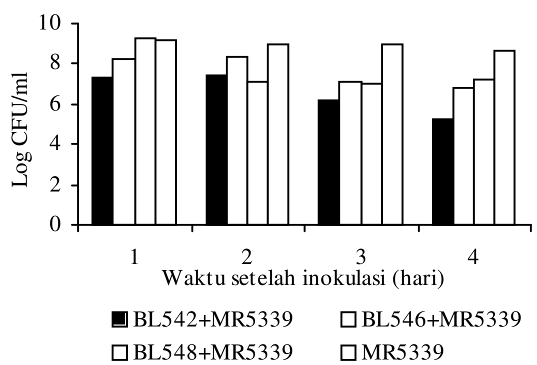
Bakteri Laut sebagai Kandidat Biokontrol. Sebanyak 603 isolat bakteri dari laut telah diperoleh dan 15 diantaranya (2.5%) potensial menghambat *V. harveyi* MR5339. Isolat BL542 memiliki daya hambat yang paling tinggi karena menghasilkan zona hambatan terbesar (11.5 mm), kemudian disusul oleh isolat BL546 dan BL547 yang masing-masing menghasilkan zona hambatan 11.1 mm.

Karakteristik dan Patogenisitas Bakteri Kandidat Biokontrol. Ke 15 isolat bakteri yang potensial sebagai bakteri biokontrol bersifat gram-negatif, dan berbentuk batang pendek kecuali isolat BL566 berbentuk batang panjang, umumnya bersifat indol negatif, motilitas negatif kecuali isolat MK107 dan BL566, dan semuanya memiliki sifat amilolitik. Semua isolat tersebut sensitif terhadap gentamisin, kloramfenikol, dan eritromisin pada dosis 25 ppm, dan beberapa diantaranya resisten terhadap furazolidon. Beberapa isolat yang diuji patogenisitasnya terhadap larva udang windu tergolong tidak patogen.

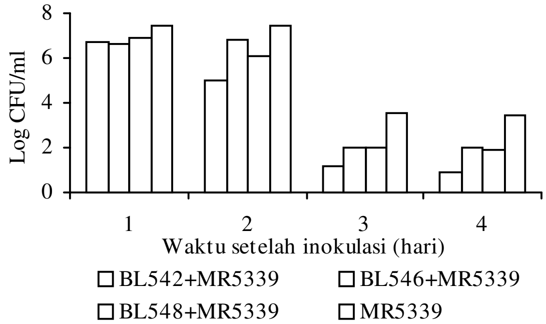
Uji Tantang Secara *In vitro*. Hasil uji tantang isolat BL542, BL546, dan BL548 terhadap *V. harveyi* MR5339 secara *in vitro* disajikan pada Gambar 1. Populasi *V. harveyi* MR5339 pada perlakuan yang diberi isolat BL542, pada hari ke 1, 2, 3, dan 4 nyata lebih rendah dibandingkan populasi *V. harveyi* MR5339 yang diberi isolat biokontrol lainnya ($P<0.05$), kecuali pada hari ke 2 terhadap yang menggunakan isolat BL548 sebagai bakteri penantang.

Populasi *V. harveyi* MR5339 pada air pemeliharaan larva udang. Jumlah *V. harveyi* MR5339 dalam air pemeliharaan larva udang selama penelitian disajikan pada Gambar 2. Populasi *V. harveyi* MR5339 dalam air pemeliharaan larva udang windu pada semua perlakuan biokontrol mengalami penurunan dari hari ke 1 sampai hari ke 4 sejak diinokulasi. Namun penurunan yang paling tinggi pada perlakuan yang menggunakan isolat BL542, yaitu dari 10^7 CFU/ml pada hari ke 0 menjadi 0.8×10^1 CFU/ml pada hari ke 4.

Perubahan populasi *V. harveyi* MR5339 dan populasi bakteri biokontrol dalam air pemeliharaan larva udang windu selama penelitian disajikan pada Gambar 3. Populasi *V. harveyi* MR5339 dari hari ke 1 sampai ke 4 lebih rendah jika dibandingkan populasi biokontrol (BL542). Hal ini menunjukkan bahwa isolat BL542 efektif menekan pertumbuhan *V. harveyi* MR5339 selama percobaan.



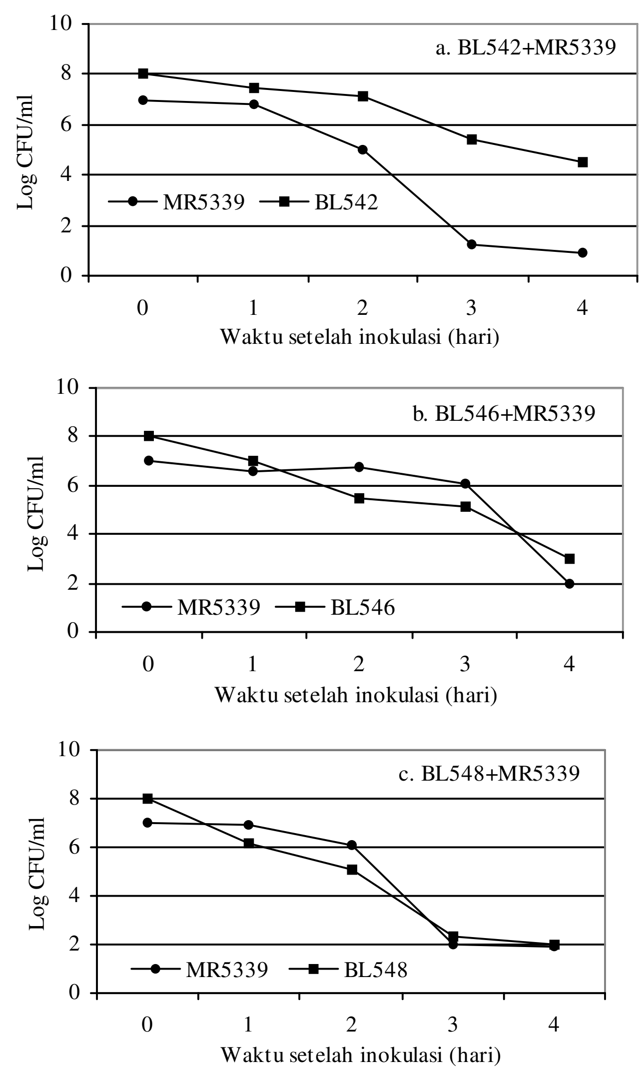
Gambar 1. Populasi *V. harveyi* MR5339 pada uji tantang secara *in vitro*.



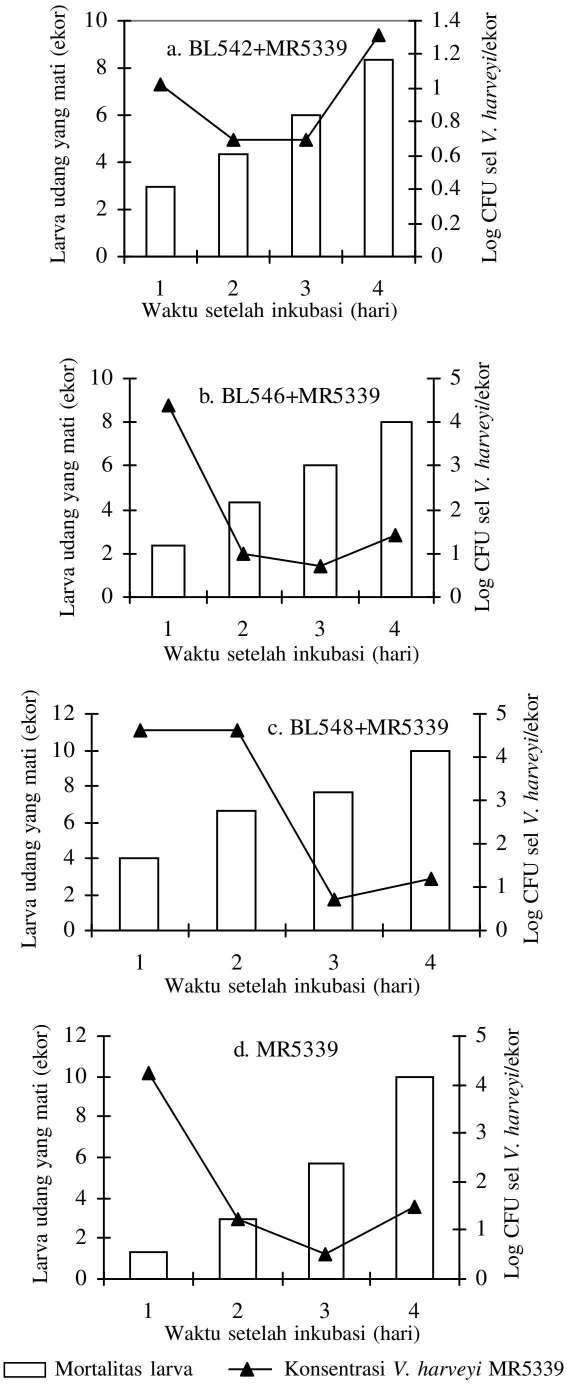
Gambar 2. Populasi bakteri *V. harveyi* MR5339 dalam air pemeliharaan secara *in vitro* larva udang windu PL7.

Sedangkan isolat BL546 dan BL548 memperlihatkan pola penghambatan terhadap perkembangan populasi *V. harveyi* MR5339 yang relatif hampir sama, yaitu dari hari ke 1 sampai hari ke 4 populasi *V. harveyi* MR5339 relatif sama dengan populasi BL546 dan BL548, bahkan pada pada hari ke 2 dan ke 3 populasi *V. harveyi* MR5339 lebih tinggi dibanding dengan populasi BL546, demikian pula populasi *V. harveyi* MR5339 lebih tinggi dibanding dengan populasi BL548 pada hari ke 1 dan ke 2 artinya daya hambat kedua isolat ini terhadap *V. harveyi* MR5339 tidak sebaik isolat BL542.

Kolonisasi *V. harveyi* MR5339, Bakteri Biokontrol, dan Mortalitas Larva Udang. Jumlah larva udang yang mati dan jumlah *V. harveyi* MR5339 yang melekat pada larva udang disajikan pada Gambar 4. Jumlah MR5339 yang mengkolonisasi larva udang secara keseluruhan paling rendah pada perlakuan yang menggunakan isolat BL542 sebagai bakteri biokontrol. Jadi isolat BL542 lebih efektif menghambat kolonisasi MR5339 pada larva udang windu dibanding isolat BL546 dan BL548. Namun demikian hubungan antara jumlah larva yang mati dengan jumlah MR5339 yang melekat pada larva udang windu sukar untuk dijelaskan.



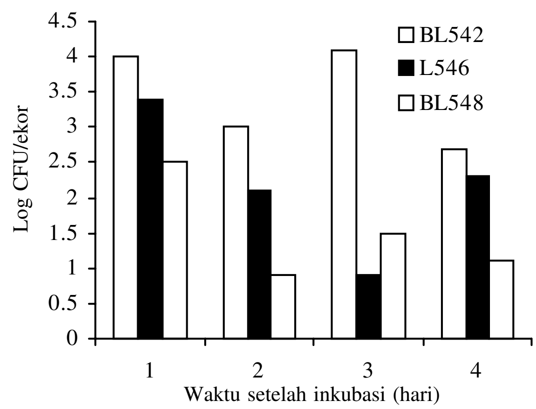
Gambar 3. Perubahan populasi *V. harveyi*, MR5339 dan populasi bakteri biokontrol dalam air pemeliharaan larva udang windu PL7.



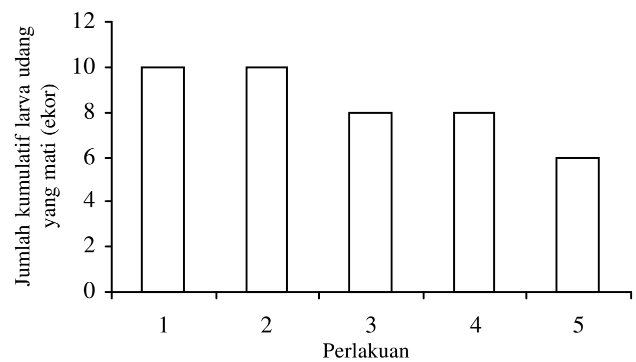
Gambar 4. Pengaruh jumlah sel *V. harveyi* MR5339 terhadap jumlah larva udang PL7 yang mati.

Jumlah bakteri BL542 yang mengkolonisasi larva udang windu dari awal hingga akhir penelitian selalu lebih tinggi dibandingkan dengan bakteri BL546 dan BL548 (Gambar 5). Jumlah kumulatif larva udang windu yang mati pada akhir penelitian (96 jam perendaman) disajikan pada Gambar 6. Pada gambar tersebut terlihat bahwa jumlah kumulatif larva udang windu yang mati tertinggi pada kontrol positif dan perlakuan dengan isolat BL548, yaitu masing-masing 10 ekor, kemudian diikuti oleh isolat BL542 dan BL546, 8 ekor, dan terendah pada kontrol negatif yaitu 6 ekor. Hal ini menunjukkan bahwa isolat BL542 dan BL546 lebih efektif menekan daya patogenisitas *V. harveyi* MR5339 terhadap larva udang dibanding dengan isolat BL548, sehingga kematian larva udang dapat dikurangi.

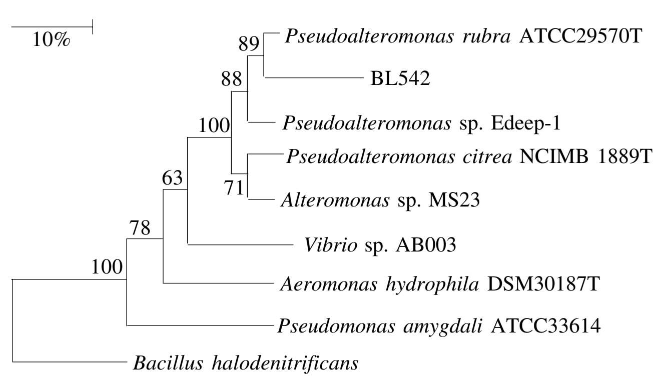
Identifikasi Molekular terhadap Isolat BL542. Hasil analisis sekuen gen 16S-rRNA dari isolat BL542 menunjukkan bahwa isolat BL542 termasuk dalam kelompok Proteobacteria, sub divisi gamma, famili Alteromonadaceae, genus *Pseudoalteromonas*, spesies *Pseudoalteromonas* sp. Edeep-1 dengan indeks kedekatan sebesar 88.29% berdasarkan pohon filogenetiknya (Gambar 7).



Gambar 5. Populasi bakteri biokontrol pada larva udang windu PL7.



Gambar 6. Histogram jumlah kumulatif larva udang yang mati setelah 96 jam perendaman. 1. Perendaman dengan *V. harveyi* MR5339 (Kontrol Positif), 2. Perendaman dengan isolat BL548, 3. Perendaman dengan isolat BL542, 4. Perendaman dengan isolat BL546, 5. Tidak menggunakan Bakteri (Kontrol negatif).



Gambar 7. Pohon filogenetik isolat BL542.

PEMBAHASAN

Jumlah isolat bakteri laut yang menghambat pertumbuhan *V. harveyi* (MR5339) (2.5% dari 603 isolat) yang di dapatkan dalam penelitian ini tidak berbeda jauh dengan apa yang telah didapatkan oleh peneliti sebelumnya, yaitu 6.7% dari 64 isolat (Tjahjadi *et al*. 1994), 12% dari 125 isolat (Rosa *et al*. 1997), dan 1% dari 273 isolat (Haryanti *et al*. 2000). Hasil ini menunjukkan bahwa lautan memiliki potensi sebagai penghasil bakteri biokontrol terhadap vibriosis.

Pada umumnya bakteri yang potensial menghambat pertumbuhan *V. harveyi* yang diisolasi dari lautan ini termasuk bakteri gram negatif dan berbentuk batang pendek. Hasil yang serupa ditemukan oleh Tjahyadi *et al.* 1994, sekitar 67% dari 45 isolat bakteri yang disolasi dari air laut dan air pemeliharaan larva udang bersifat gram negatif. Umumnya koloni kuning; sensitif terhadap beberapa macam antibiotika seperti gentamisisn, kloramfenikol, rifampisin dan eritromisin; dan tidak bersifat patogen terhadap larva udang windu.

Hasil uji daya hambat dalam cawan petri dan uji tantang secara *in vitro* dalam gelas erlemeyer serta uji tantang secara *in vivo* dalam wadah pemeliharaan larva udang windu menunjukkan bahwa isolat BL542 paling baik menekan pertumbuhan *V. harveyi* MR5339. Keunggulan isolat bakteri BL542 dalam menekan pertumbuhan *V. harveyi* MR5339 dalam air pemeliharaan larva dan mengurangi pelekatan *V. harveyi* MR5339 terhadap larva udang windu disebabkan bakteri BL542 lebih cepat berkolonisasi sehingga *V. harveyi* MR5339 tidak dapat mengkolonisasi larva udang windu secara maksimal. Menurut Weller (1988) dan Sullivan dan Gara (1992) bahwa supresi patogen oleh agen biokontrol karena kompetisi substrat, pengusiran karena ceruk ekologi yang sama, produksi antibiotika, asam organik, dan siderofor (protein pengkelat besi).

Perbedaan jumlah larva udang yang mati setiap pengamatan belum terlihat jelas untuk semua isolat biokontrol sehingga tidak tampak hubungan antara jumlah larva mati dengan jumlah *V. harveyi* MR5339 yang melekat pada larva udang windu. Kejadian kondisi fisiologis dari larva udang yang dipakai tidak terlalu baik sehingga pada kontrol negatif pun (tanpa bakteri) larva udang mengalami kematian. Efek bakteri biokontrol tentu akan lebih kelihatan seandainya larva udang yang digunakan dalam kondisi fisiologis yang baik dan bebas bakteri patogen. Dalam penelitian ini larva udang yang digunakan sudah mengandung bakteri yang dapat tumbuh pada media TCBS Agar (warna hijau dan kuning meskipun tidak berpendar) dengan konsentrasi 10^1-10^2 CFU/ekor sehingga diduga turut mempengaruhi efektifitas bakteri biokontrol dalam menekan kematian larva udang. Penyebab lainnya, *V. harveyi* MR5339 yang digunakan diduga kurang virulen untuk larva udang windu meskipun saat diisolasi dari sumbernya bersifat patogen.

Isolat BL542 memiliki kemiripan (88%) dengan *Pseudoalteromonas* sp. Edeep-1 berdasarkan sekuen gen 16S-rRNA. Sebelumnya telah dilaporkan bahwa *Pseudoalteromonas* strain BY-9 yang diisolasi dari air laut menghasilkan antibakterial (Haryanti *et al*. 2000). Bakteri BY-9 dapat menghidrolisis amilosa, D-mannosa, D-fruktosa, tetapi tidak dapat menggunakan sukrosa, maltosa, sitrat, gliserol. Kandungan G+C mol (%) DNA bakteri BY-9 adalah 42.5-45™. (Haryanti *et al*. 2000). Spesies lain yang juga telah dilaporkan memiliki aktifitas algisidal adalah *Pseudoalteromonas* sp. strain Y yang dapat menurunkan *blooming algae* (Lovejoy *et al*. 1998) dan *Pseudoalteromonas* sp. strain A28 yang dapat membunuh S*keletonema costatum* strain NIES-324 secara *in vitro* dalam cawan petri (Lee *et al*. 2000). Hasil analisis lebih lanjut menunjukkan bahwa *Pseudoalteromonas* sp. strain A28 menghasilkan substansi ektraseluler yang diidentifikasi sebagai serin protease (Lee *et al*. 2000).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Proyek PAATP Badan Litbang Pertanian, International Foundation for Science (IFS), Sweden, dan Research Center for Microbial Diversity (RCMD), FMIPA, IPB yang telah mendanai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Chanratchakool P, Turnbull JF, Smith SF, Limsuwan C. 1995. Health management in shrimp ponds. 2nd Edition. Aquatic Animal Health Research Institute. Departement of Fisheries. Kasetsart University Campus. Bangkok. hlm 111.

Devaraja TN, Otta SK, Shubha G, Karunasagar I, Tauro P, Karunasagar I. 1998. Immunostimulation of shrimp through oral administration of *Vibrio* bacteria and yeast glucan. Di dalam: Flegel TW (ed). Advances in shrimp biotechnology. Bangkok: National Center for Genetic Engineering and Biotechnology. hlm 167-170.

Hadioetomo RS. 1993. Mikrobiologi dasar dalam praktek: Teknik dan prosedur dasar laboratorium. Jakarta: PT Gramedia. hlm 62-68.

Hala Y. 1999. Penggunaan gen penanda molekular untuk deteksi pelekatan dan kolonisasi *vibrio harveyi* pada larva udang windu (*Penaeus monodon*). [Disertasi]. Bogor: Program Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.

Hameed ASS. 1995. Susceptibility of three *Penaeus* species to a *Vibrio campbellii*-like bacterium. *J World Aqua Soc* 26:315-319.

Haryanti, Sugama K, Tsamura S, Nishijima T. 2000. Vibriostatic bacterium isolated from seawater: Potentiality as probiotic agent in the rearing of *Penaeus monodon* larvae. *Ind Fish Res J* 6:26-32.

Lee SO, Kato J, Takiguchi N, Kuroda A, Ikeda T, Mitsutani A, Ohtake H. 2000. Involvement of an Extracellular protease in algicidal activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. Strain A28. *Appl Environ Microbiol* 66:4334-4339.

Lovejoy C, Bowman JP, Hallegraeff GM. 1998. Algicidal effects of a novel marine *Pseudoalteromonas* isolate (class proteobacteria, gamma subdivision) on harmful algal bloom species, of the genera Chattonela, Gymnodinium, and Heterosigma. *Appl Environ Microbiol* 64:2806-2813.

Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, Marthin TA, Fry JC, Hiom SJ, Wade WG. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-spesifik PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S-rRNA. *Appl Environ Microbiol* 64:795-799.

Muir P. 1996. Identification of *Vibrio* and *Pseudomonas* Bacteria. Departement of Microbiology Biomedical and Tropical Veterinary Science. Australia: James Cook University of North Queensland. hlm 6.

Muliani, Atmomarsono M, Madeali MI. 1998a. Pengaruh penggunaan kekerangan sebagai biofilter terhadap kelimpahan dan komposisi jenis bakteri pada budidaya udang windu (*Penaeus monodon*) dengan sistem resirkulasi air. *J Pen Perik Ind* 3:54-61.

Muliani, Suryati E, Ahmad T. 1998b. Penggunaan ekstrak spons untuk penanggulangan bakteri *Vibrio* spp. pada udang windu (*Penaeus monodon*). *J Pen Perik Ind* 1:108-115.

Rengpipat S, Rukpratanporn S, Piyatiratitivorakul S, Menasveta P. 1998. Probiotics in Aquaculture: A case study of probitics for larvae of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Di dalam: Flegel TW (ed). Advances in shrimp biotechnology. Bangkok: National Center for Genetic Engineering and Biotechnology. hlm 177-181.

Rosa D, Zafran, Tufik I, Girsang MA. 1997. Pengendalian *Vibrio harveyi* secara biologis pada larva udang windu (*Penaeus monodon*): I. Isolasi Bakteri Penghambat. *J Pen Perik Ind* 3:1-10.

Sullivan DJ, Gara FO. 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonaas* sp. involved in suppression of plant root pathogen. *Microbiol Rev* 56:662-676.

Suryati E, Rosmiati, Moka W, Hala Y. 2000. Hydrozoan *Aglaophenia* sp. Bioactive Substance Analysis for Bactericide. *IFR Journal* 6:55-61.

Suwanto A, Yogiara, Suryanto D, Tan I, Puspitasari E. 2000. Selected protocols. Training Course on Advances in Molecular Biology Techniques to Assess Microbial Diversity. Bogor: BIOTROP.

Tjahjadi MR, Angka SL, Suwanto A. 1994. Isolation and evaluation of marine bacterial for biocontrol of luminous bacterial diseases in tiger shrimp larvae (*Penaeus monodon Fab*). *Aspac J Mol Biol Biotechnol* 2:347-352.

Weller DM. 1988. Biological control of soilborn plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 26:379-407.