

BAKTERI PROBIOTIK DALAM BUDIDAYA UDANG: SELEKSI, MEKANISME AKSI, KARAKTERISASI, DAN APLIKASINYA SEBAGAI AGEN BIOKONTROL

Widanarni¹⁾, Sukenda, Mia Setiawati

ABSTRACT

PROBIOTIC BACTERIA IN SHRIMP CULTURES: ITS SELECTION, MECHANISM OF ACTION, CHARACTERIZATION, AND APPLICATION AS A BIOCONTROL AGENT

Bacterial disease attack occurs at the hatchery stage, which is considered to be the most serious threat, and often results in mass mortality of shrimp larvae by vibriosis which is that caused by a luminous bacterium identified as *Vibrio harveyi*. This research was carried out to obtain local isolates of probiotic bacteria that were able to inhibit the growth of *V. harveyi* and effectively apply it as a biocontrol of vibriosis in shrimp cultures. The research was carried out as follows: (1) *In vitro* and *in vivo* selection of probiotic bacteria candidates, (2) Study of the action mechanism and characterization of the selected probiotic bacteria, (3) Study on application of the selected probiotic bacteria as a biocontrol agent in shrimp cultures. Results of *in vitro* and *in vivo* selection provided the best three isolates, which were 1Ub, SKT-b and Ua. The survival rate of shrimp larvae which were not only inoculated by *V. harveyi* but also with 1Ub, SKT-b and Ua probiotic bacteria were 88.33, 83.33, and 81.67% respectively; whereas the positive control treatment (merely inoculated with *V. harveyi*) gave a 41.67% survival rate and the negative control (without bacterial addition) was 68.33%. Studies using a rifampicin resistant marker (Rf^R) demonstrated that the number of *V. harveyi* MR5339 Rf^R cells in treatments without probiotic addition were higher than the treatment with the probiotic bacteria, in dead larvae, living larvae, as well as in the culture media. Partial sequencing of the 16S-rRNA gene showed that the 1Ub isolate was similar to *Pseudoalteromonas piscicida*, whereas the SKT-b and Ua isolates were similar to *Vibrio alginolyticus*. Selected probiotic bacteria could be applied directly to shrimp larva culture media, or orally through enrichment of both natural and artificial food.

Keywords: *Penaeus monodon* larvae, probiotic bacteria, vibriosis

ABSTRAK

Penyakit yang disebabkan bakteri yang paling serius dan sering menyebabkan terjadinya kematian massal pada larva udang windu di tingkat pembenihan adalah penyakit vibriosis; terjadi akibat serangan bakteri berpendar yang diidentifikasi sebagai *Vibrio harveyi*. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat lokal bakteri probiotik yang potensial mampu menghambat pertumbuhan *V. harveyi* serta efektif diaplikasikan dalam penanggulangan penyakit vibriosis. Tahapan penelitian mencakup: (1) Studi tentang seleksi *in vitro* dan *in vivo* bakteri kandidat probiotik, (2) Studi tentang mekanisme aksi dan karakterisasi bakteri probiotik terpilih, (3) Studi tentang aplikasi bakteri probiotik terpilih sebagai agen biokontrol pada budidaya udang. Hasil seleksi *in vitro* dan *in vivo* diperoleh tiga isolat terbaik yaitu 1Ub, SKT-b, dan Ua. Kelangsungan hidup larva udang yang selain diinokulasi *V. harveyi* juga diberi bakteri probiotik 1Ub, SKT-b dan Ua berturut-turut adalah 88,33, 83,33, dan 81,67%, sedangkan perlakuan kontrol positif (hanya

diinokulasi *V. harveyi* saja) sebesar 41,67% dan kontrol negatif (tanpa penambahan bakteri) sebesar 68,33%. Hasil studi menggunakan penanda *rifampisin resisten* (Rf^R) menunjukkan bahwa jumlah sel *V. harveyi* MR5339 Rf^R pada perlakuan tanpa penambahan probiotik lebih tinggi dibanding pada perlakuan dengan penambahan probiotik, baik pada larva mati, larva hidup, maupun air media pemeliharaan. Hasil analisis sekuen sebagian gen 16-rRNA menunjukkan bahwa isolat 1Ub memiliki kemiripan dengan *Pseudoalteromonas piscicida*, sedangkan isolat SKT-b dan Ua memiliki kemiripan dengan *Vibrio alginolyticus*. Bakteri probiotik terpilih dapat diaplikasikan langsung pada media pemeliharaan larva udang atau melalui pengayaan pakan baik pakan alami maupun pakan buatan.

Kata kunci: bakteri probiotik, larva *Penaeus monodon*, vibriosis

PENDAHULUAN

Serangan penyakit bakteri pada tingkat pembenihan yang paling serius dan sering menyebabkan terjadinya

¹⁾ Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan IPB, Jl. Agatis, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680
* Penulis korespondensi: (+62251) 6319729

kematian massal pada larva udang windu adalah serangan bakteri berpendar yang diidentifikasi sebagai *Vibrio harveyi* (Lavilla-Pitogo *et al.* 1990; Karunasagar *et al.* 1994; Ruangpan *et al.* 1998). Serangan ini menyebabkan penyakit vibriosis. Bakteri ini pada umumnya menyerang larva udang pada stadia zoea, mysis dan awal pascalarva (Lavilla-Pitogo *et al.* 1990) sehingga menjadi kendala dalam penyediaan benih udang yang sehat dalam jumlah besar yang diperlukan untuk produksi udang.

Usaha untuk menanggulangi penyakit vibriosis telah dilakukan dengan menggunakan berbagai jenis antibiotik. Namun penggunaan antibiotik secara terus-menerus dengan dosis sub-optimal telah mengakibatkan *V. harveyi* menjadi resisten (Karunasagar *et al.* 1994; Tjahjadi *et al.* 1994; Teo *et al.* 2000). Penggunaan vaksin juga sulit diterapkan karena galur *V. harveyi* yang menyerang larva udang sangat beragam (Suwanto *et al.* 1998).

Dengan adanya kelemahan-kelemahan dari berbagai upaya yang telah dilakukan, penggunaan bakteri probiotik sebagai agen biokontrol pada pembenihan udang menawarkan alternatif pemecahan untuk menanggulangi permasalahan tersebut. Dasar pendekatan ini adalah dengan menggunakan aktivitas mikroorganisme yang dapat menekan atau menghambat pertumbuhan *V. harveyi* tanpa menimbulkan dampak buruk pada sistem keseimbangan ekologis mikrob. Cara ini telah terbukti berhasil dan banyak digunakan pada usaha hewan ternak (Fuller 1992; Ohhira *et al.* 1996), namun baru akhir-akhir ini diteliti untuk diaplikasikan pada sistem budidaya perairan, misalnya pada budidaya ikan (Skjermo, Vadstein 1999; Gram *et al.* 1999), kerang-kerangan (Douillet, Langdon 1994; Riquelme *et al.* 1997), udang (Tjahyadi *et al.* 1994; Rengpipat *et al.* 1998a, 1998b, 2000; Gomez-Gil *et al.* 2000).

Penelitian ini bertujuan mendapatkan isolat lokal bakteri probiotik yang potensial mampu menghambat pertumbuhan *V. harveyi* patogen dan efektif diaplikasikan dalam penanggulangan penyakit vibriosis.

BAHAN DAN METODE

Seleksi *In Vitro* dan *In Vivo* Bakteri Kandidat Probiotik

Isolasi Bakteri Kandidat Probiotik

Bakteri kandidat probiotik diisolasi dari berbagai lingkungan tambak dan hatchery yaitu di Balai Pengembangan Benih Ikan Laut Payau dan Udang (BPBILAPU), Pangandaran, Jawa Barat dan hatchery udang PT Biru Laut Khatulistiwa serta tambak udang intensif di Lampung. Contoh diambil meliputi berbagai stadia udang dan media pemeliharannya, pakan alami larva udang berupa kultur alga dan Artemia. Setiap contoh disebarkan pada media *seawater complete* (SWC)-agar (5g *bactopectone*, 1g ekstrak khamir, 3ml gliserol, 15g agar, 750ml air laut, dan 250ml akuades) dan selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang (28 hingga 31)°C selama 24 jam.

Koloni yang terpisah kemudian dipilih secara acak untuk mendapatkan isolat murni dan dipelajari lebih lanjut.

Vibrio harveyi yang digunakan dalam penelitian ini adalah *V. harveyi* MR5339, diisolasi dari udang sakit dan merupakan koleksi Balai Penelitian Perikanan Pantai, Maros, Sulawesi Selatan, serta telah diuji sifat patogennya pada larva udang windu.

Uji *In Vitro* Bakteri Kandidat Probiotik

Uji *In Vitro* Bakteri Kandidat Probiotik dengan Metode Kirby-Bauer

Semua isolat murni yang diperoleh, diuji daya hambatnya terhadap *V. harveyi* MR5339 secara *in vitro* dengan metode Kirby-Bauer, yakni dengan mengamati diameter zona hambat pada media SWC-agar. Masing-masing sebanyak 1 ose bakteri kandidat probiotik dan *V. harveyi* MR5339 disuspensikan ke dalam 500µl larutan fisiologis (NaCl 0,85%) steril di dalam tabung *ependorf*. Selanjutnya sebanyak 50 µl suspensi *V. harveyi* MR5339 disebar pada media SWC-agar dan dibiarkan sampai agak kering. *Paper disk* steril merk Whatman nomor 42 dengan diameter 5mm diletakkan di atas media SWC-agar yang telah ditebarkan *V. harveyi* MR5339 dan kemudian sebanyak 5µl suspensi bakteri kandidat probiotik diteteskan di atas *paper disk* tersebut. Pengujian dilakukan dengan 4 ulangan dan 1 kontrol (larutan fisiologis). Setelah diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam, zona hambat bakteri diukur.

Uji *In Vitro* Bakteri Kandidat Probiotik dengan Metode Kultur Bersama

Bakteri kandidat probiotik yang tidak menghasilkan zona hambat pada pengujian dengan metode Kirby-Bauer diseleksi kembali untuk mengukur kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan *V. harveyi* dengan melakukan kultur bersama dalam media SWC-cair. Sebelum pengujian, bakteri kandidat probiotik dari golongan *Vibrio* diuji sensitivitasnya terhadap antibiotik rifampisin dengan cara menumbuhkan isolat-isolat tersebut pada media SWC-agar 10% w/v dan penambahan rifampisin 50µg.ml⁻¹ (SWC+Rf). Setelah diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam, dilakukan pengamatan pertumbuhan koloni pada media tersebut untuk mengetahui respon resistensi. Uji *in vitro* bakteri ini dilakukan untuk menseleksi bakteri kandidat probiotik sehubungan dengan penggunaan penanda resisten rifampisin (Rf^R) pada *V. harveyi*.

Pengaruh penghambatan bakteri kandidat probiotik pada *V. harveyi* MR5339 Rf^R diketahui dengan cara menumbuhkan setiap isolat murni bakteri kandidat probiotik (*Vibrio* dan non-*Vibrio*) pada media SWC-cair 10% dengan kepadatan 10⁴ cfu.ml⁻¹. Selanjutnya ditambahkan 10⁴ cfu.ml⁻¹ *V. harveyi* MR5339 Rf^R. Setelah diinkubasi menggunakan larutan fisiologis steril sampai 10¹ untuk kultur campuran dan sampai 10⁻⁵ untuk kontrol (*V. harveyi* MR5339 Rf^R tanpa isolat kandidat probiotik).

Hasil pengenceran kemudian disebar pada media SWC+Rf untuk bakteri kandidat probiotik dari golongan *Vibrio* dan media TCBS-agar untuk isolat non-*Vibrio*. Hasil penyebaran kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Apabila *V. harveyi* MR5339 Rf^R pada tabung kontrol (tanpa isolat probiotik) tumbuh jauh lebih banyak dibanding pada kultur campuran (*V. harveyi* MR5339 Rf^R dicampur dengan isolat probiotik), maka berarti isolat probiotik tersebut mampu menghambat pertumbuhan *V. harveyi* MR5339 Rf^R.

Uji Patogenisitas Bakteri Kandidat Probiotik

Sebelum dilakukan ujiantang dengan *V. harveyi* pada larva udang, sebanyak 6 isolat yang paling potensial berdasarkan uji *in vitro* (masing-masing 3 isolat dari metode Kirby-Bauer dan kultur bersama) diuji patogenisitasnya pada larva udang. Pengujian dilakukan dengan menambahkan suspensi isolat kandidat probiotik berkonsentrasi 10⁶cfu.ml⁻¹ pada media pemeliharaan larva udang. Larva udang dipelihara dalam stoples berisi air laut steril 2l dengan kepadatan 10 ekor per l dan diberi pakan *Artemia* 3 hingga 5 individu per ml sebanyak 4 kali per hari. Pemeliharaan larva udang dilakukan selama 5 hari dan larva yang mati dihitung setiap hari. Pada akhir percobaan dihitung kelangsungan hidup larva udang dan dibandingkan dengan kontrol, yakni perlakuan tanpa penambahan isolat kandidat probiotik.

Uji Tantang Bakteri Kandidat Probiotik dengan *V. harveyi* MR5339 Rf^R pada Larva Udang Windu

Enam isolat bakteri kandidat probiotik yang paling potensial berdasarkan uji *in vitro* (masing-masing 3 isolat dari metode Kirby-Bauer dan kultur bersama) dan tidak bersifat patogen, diuji efektivitasnya dalam menghambat serangan *V. harveyi* pada larva udang. Isolat kandidat probiotik dengan konsentrasi 10⁶cfu.ml⁻¹ dimasukkan ke dalam wadah pemeliharaan udang sehari setelah larva udang dimasukkan. Larva udang dipelihara dalam stoples yang berisi air laut steril 2l dengan kepadatan 10 ekor per l. Setelah dilakukan kokultivasi dengan larva udang selama 6 jam, *V. harveyi* MR5339 Rf^R dimasukkan dengan konsentrasi 10⁶cfu.ml⁻¹ (LD₅₀). Percobaan dilakukan dengan tiga ulangan termasuk kontrol (tanpa penambahan *V. harveyi* dan isolat probiotik). Selama percobaan larva udang diberi pakan *Artemia* sebanyak 3 hingga 5 individu per ml sebanyak 4 kali sehari. Pengantian air dan penyiponan dilakukan setiap hari; air diganti sebanyak 10% dari volume total air dalam wadah pemeliharaan.

Pengamatan dilakukan selama 5 hari, dan pada akhir percobaan dihitung kelangsungan hidup dan pertumbuhan larva udang. Kelangsungan hidup larva udang dihitung menggunakan rumus Effendie (1979), sedangkan pertumbuhan dihitung berdasarkan pertambahan bobot dan panjang dengan rumus Huisman (1987):

$$SR = \frac{N_t}{N_0} \times 100$$

Keterangan:

SR: Tingkat kelangsungan hidup (%)

N_t : Jumlah udang yang hidup pada akhir perlakuan (ekor)

N₀ : Jumlah udang yang hidup pada awal perlakuan (ekor)

$$\alpha = \left[\sqrt{\frac{t}{W_0} \frac{W_t}{L_t}} - 1 \right] \times 100\% \quad \text{dan}$$

$$\alpha = \left[\sqrt{\frac{t}{L_0} \frac{L_t}{L_0}} - 1 \right] \times 100\%$$

Keterangan:

α : Laju pertumbuhan panjang atau bobot udang (%)

t : Lama waktu pemeliharaan udang (hari)

W_t : Bobot rata-rata akhir udang (mg)

W₀ : Bobot rata-rata awal udang (mg)

L_t : Panjang rata-rata akhir udang (mm)

L₀ : Panjang rata-rata awal udang (mm)

Mekanisme Aksi Bakteri Probiotik pada Larva Udang

Mekanisme aksi bakteri probiotik dipelajari melalui esei pelekatan menggunakan penanda molekuler rifampisin resisten (Rf^R) untuk mengetahui efektivitas penghambatan bakteri kandidat probiotik terhadap pelekatan dan kolonisasi *V. harveyi* pada larva udang.

Isolat yang digunakan dalam penelitian ini adalah 1Ub dan Ua (isolat terbaik yang dihasilkan pada penelitian tahap 1) dan SKT-b (hasil isolasi oleh Widanarni *et al.* 2003). Ketiga isolat tersebut telah diuji dan mampu menghambat pertumbuhan *V. harveyi* patogen pada uji *in vitro* dan meningkatkan kelangsungan hidup larva udang windu.

Pembuatan Mutan Bakteri Probiotik Resisten Rifampisin (Rf^R)

Pembuatan bakteri probiotik Rf^R dilakukan melalui mutasi spontan dengan menyebarkan 1,0ml suspensi bakteri probiotik sensitif rifampisin yang telah dipekatkan menjadi 0,1ml pada media SWC+Rf. Koloni yang tumbuh pada media tersebut merupakan mutan bakteri probiotik Rf^R.

Pertumbuhan Bakteri Probiotik Rf^R

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

Uji Daya Hambat Bakteri Probiotik Rf^R terhadap *V. harveyi* pada Larva Udang

Tiga isolat mutan bakteri probiotik Rf^R diuji kembali efektivitasnya dalam menghambat pertumbuhan *V. harveyi* patogen pada larva udang. Pengujian dilakukan sama seperti tipe liarnya, namun selain terhadap kelangsungan hidup dan pertumbuhan, pengamatan juga dilakukan pada populasi bakteri probiotik dan *V. harveyi* serta total bakteri baik pada air pemeliharaan maupun larva udang. Pengamatan dilakukan menggunakan media TCBS+Rf untuk isolat *Vibrio* dan SWC+Rf untuk isolat non *Vibrio*. Pengujian dilakukan selama 12 hari, dengan kepadatan larva 10 ekor per l. Selama pengujian, larva udang diberi pakan berupa nauplii *Artemia* dengan frekuensi pemberian pakan 5× sehari. Pertumbuhan bobot dan panjang total diamati pada awal dan akhir percobaan, sedangkan kelangsungan hidup dihitung pada akhir percobaan.

Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri Probiotik

Karakterisasi isolat probiotik terpilih dilakukan terhadap morfologi koloni, bentuk sel dan sifat gram dengan pewarnaan gram, sedangkan identifikasi isolat dilakukan berdasarkan hasil sekuensing gen 16S-rRNA (Marchesi *et al.* 1998).

Aplikasi Bakteri Probiotik pada Larva Udang

Aplikasi Bakteri Probiotik pada Berbagai Stadia Larva Udang

Percobaan ini menggunakan larva udang windu stadia nauplius yang dipelihara hingga stadia pasca-larva 10 (PL₁₀) dan diberi bakteri probiotik SKT-b dengan konsentrasi 10⁶cfu.ml⁻¹ pada waktu yang berbeda. Secara keseluruhan, percobaan terdiri dari 6 perlakuan dan 1 kontrol dengan 3 ulangan yaitu: (A) Pemberian bakteri probiotik pada awal stadia nauplius, (B) Pemberian bakteri probiotik pada awal stadia zoea, (C) Pemberian bakteri probiotik pada awal stadia mysis, (D) Pemberian bakteri probiotik pada awal stadia pasca-larva 1, (E) Pemberian bakteri probiotik pada awal stadia nauplius, zoea, mysis dan pasca-larva, (F) Pemberian bakteri probiotik setiap hari, (G) Kontrol (tanpa pemberian bakteri probiotik).

Pemeliharaan larva dilakukan dalam wadah stoples kaca dengan volume air pemeliharaan 2 liter dan padat penebaran 20 ekor per liter. Selama pemeliharaan, larva udang diberi pakan alami berupa *Skeletonema* dan *Artemia*. Parameter yang diamati selama penelitian adalah kelangsungan hidup larva udang, pertumbuhan panjang dan bobot larva, populasi bakteri dan kualitas air.

Aplikasi Bakteri Probiotik pada Berbagai Konsentrasi

Penelitian ini menggunakan larva udang windu stadia PL₁ dan dipelihara hingga stadia PL₁₀. Bakteri probiotik SKT-b ditambahkan ke dalam media pemeliharaan larva udang dengan konsentrasi yang berbeda, yaitu (A) Pem-

berian bakteri probiotik dengan konsentrasi 10³cfu.ml⁻¹, (B) Pemberian bakteri probiotik dengan konsentrasi 10⁴cfu.ml⁻¹, (C) Pemberian bakteri probiotik dengan konsentrasi 10⁵cfu.ml⁻¹, (D) Pemberian bakteri probiotik dengan konsentrasi 10⁶cfu.ml⁻¹, (E) Pemberian bakteri probiotik dengan konsentrasi bertingkat dari 10³ hingga 10⁶cfu.ml⁻¹, (F) Kontrol (tanpa pemberian bakteri probiotik).

Larva dipelihara dalam wadah stoples kaca dengan volume air pemeliharaan 2l dan padat penebaran 20 ekor per l. Selama pemeliharaan, larva udang diberi pakan alami *Artemia*. Parameter yang diamati selama penelitian adalah kelangsungan hidup larva udang, pertumbuhan panjang dan bobot larva, populasi bakteri dan kualitas air.

Aplikasi Bakteri Probiotik Melalui Pengayaan *Artemia*

Percobaan menggunakan dua perlakuan, pertama larva udang diberi pakan *Artemia* yang diperkaya dengan *Vibrio* SKT-b dan kedua larva udang diberi pakan *Artemia* tanpa pengayaan (kontrol). Pengayaan dilakukan dengan cara menambahkan *Vibrio* SKT-b pada media pemeliharaan *Artemia* dengan konsentrasi awal 10⁶cfu.ml⁻¹ media. Lama waktu pengayaan ditentukan berdasarkan lama waktu yang mampu menghasilkan akumulasi bakteri probiotik tertinggi pada tubuh *Artemia*. *Artemia* diberikan ke larva udang selama 14 hari. Pertumbuhan panjang dan bobot larva udang diamati pada awal dan akhir percobaan, sedangkan kelangsungan hidup dihitung pada akhir percobaan.

Aplikasi Bakteri Probiotik Melalui Pakan Buatan

Percobaan ini menggunakan udang windu PL 36 yang dipelihara selama 42 hari dalam akuarium dengan kepadatan 15 ekor per akuarium (volume 30 liter). Pemberian pakan dilakukan 4 kali sehari, yaitu pada pukul 08.00, 12.00, 16.00, dan 22.00. Jumlah pakan yang diberikan didasarkan pada *Feeding Rate* (FR) yang disesuaikan dengan peningkatan biomassa udang. Persiapan pakan uji meliputi tahap kultur bakteri, pemisahan sel bakteri dengan media kultur, dan pencampuran bakteri pada pakan. Pencampuran pakan dengan bakteri probiotik dilakukan dengan nisbah 3:1 (Rengpipat *et al.* 1998b). Sebagai perekat digunakan putih telur sebanyak 3% dari total campuran pakan dan bakteri. Secara keseluruhan, penelitian terdiri atas 3 perlakuan dan 1 kontrol dengan 3 ulangan, yaitu kontrol (pakan+3% putih telur), SKT-b (pakan+probiotik SKT-b+3% putih telur), 1 UB (pakan+probiotik 1 UB+3% putih telur), dan komersil (pakan + probiotik komersil+3% putih telur).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Seleksi *In Vitro* dan *In Vivo* Bakteri Kandidat Probiotik

Isolat Bakteri Kandidat Probiotik

Bakteri kandidat probiotik yang berhasil diisolasi dari 34 sumber yang berbeda di lingkungan tambak dan hatchery adalah 118 isolat. Sebanyak 22 isolat berasal dari tambak pembesaran udang vaname di Desa Pinang Gading, Kalianda, Lampung Selatan, 57 isolat dari lingkungan pembenihan udang PT Biru Laut Khatulistiwa, Lampung Selatan, dan 39 isolat dari Balai Pengembangan Benih Ikan Laut Payau dan Udang (BPBILAPU) Pangandaran, Ciamis, Jawa Barat.

Penampilan warna dan bentuk koloni isolat-isolat tersebut pada media SWC-agar ada beberapa macam. Warna koloni terdiri dari krem, kuning, oranye, dan putih dengan bentuk koloni oval, bulat kecil, bulat besar dan beberapa menyebar (*swarming*). Koloni bakteri kandidat probiotik dari golongan *Vibrio* menampilkan warna kuning dan hijau pada media TCBS.

Hasil Uji *In Vitro* Bakteri Kandidat Probiotik

Hasil Uji *In Vitro* Bakteri Kandidat Probiotik dengan Metode Kirby-Bauer

Penapisan *in vitro* terhadap 118 isolat bakteri kandidat probiotik dalam menghambat pertumbuhan *V. harveyi* 5339, menghasilkan 62 isolat atau sebanyak 52,54% yang menghasilkan zona hambat. Berdasarkan diameter zona hambatnya, dipilih 3 isolat terbaik, yaitu isolat 9a yang berasal dari *Cyclotella* (pakan alami) dengan zona hambat 12,8mm, isolat Ua yang berasal dari saluran cerna udang vaname dengan zona hambat 14,5mm, dan isolat P₁₇B₆ yang berasal dari air pemeliharaan kerapu bebek dengan zona hambat 15,0 mm (Widanarni *et al.* 2008a). Isolat-isolat bakteri telah diisolasi oleh Muliani *et al.* (2003) sedikitnya 603 isolat bakteri asal laut dan 15 diantaranya (2,5%) potensial menghambat *V. harveyi* MR5339; Haryanti *et al.* (2000) juga telah mengisolasi 273 isolat bakteri dan 3 di antaranya (1%) menunjukkan adanya hambatan terhadap pertumbuhan *V. harveyi* secara *in vitro*. Hasil penelitian Riquelme *et al.* (1997) menunjukkan bahwa dari 57 isolat bakteri yang diisolasi dari air laut, 3 di antaranya (5%) potensial menghambat pertumbuhan *V. anguillarum*. Adanya peng-hambatan pertumbuhan bakteri tidak selalu dapat diamati dengan melihat adanya zona bening pada media padat. Komposisi media yang digunakan mungkin mempengaruhi jumlah senyawa antimikrob yang dihasilkan atau dilepaskan ke media. Selain itu, penghambatan pertumbuhan tidak selalu berkaitan dengan produksi senyawa antimikrob seperti antibiotik, tetapi dapat juga karena adanya senyawa metabolit primer atau adanya perubahan pH (Verschuere *et al.* 2000).

Hasil Uji *In Vitro* Bakteri Kandidat Probiotik dengan Metode Kultur Bersama

Sebanyak 51 isolat bakteri yang tidak menghasilkan zona hambat dengan metode Kirby-Bauer diuji kembali kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan *V. harveyi* menggunakan metode kultur bersama. Hasil uji

menunjukkan bahwa hampir semua bakteri yang diuji mampu menghambat pertumbuhan *V. harveyi* MR5339 Rf^R walaupun dengan daya hambat yang berbeda-beda. Tiga isolat, yaitu 1Ub, P₂₀Bf, dan 10a yang masing-masing diisolasi dari udang vaname, air pemeliharaan udang galah dan *Skeletonema costatum* menunjukkan hasil terbaik. Jumlah *V. harveyi* MR5339 Rf^R yang tumbuh dengan penambahan probiotik 1Ub, P₂₀Bf, dan 10a masing-masing sebanyak 1 cfu.ml⁻¹, 16 cfu.ml⁻¹, dan 30cfu.ml⁻¹, sedangkan pada biakan kontrol (hanya diinokulasi dengan *V. harveyi* MR5339 Rf^R), jumlah *V. harveyi* MR5339 Rf^R yang tumbuh mencapai 7,6×10⁸cfu.ml⁻¹ (Widanarni *et al.* 2008b).

Patogenisitas Bakteri Kandidat Probiotik

Sebelum diuji tantang dengan *V. harveyi* MR5339 pada larva udang, sebanyak 6 isolat terbaik hasil uji *in vitro* (masing-masing 3 isolat dari metode Kirby-Bauer dan kultur bersama) diuji patogenisitasnya terhadap pascalarva udang windu. Hasil uji patogenisitas memperlihatkan bahwa nilai kelangsungan hidup pada perlakuan dengan penambahan bakteri kandidat probiotik adalah tidak berbeda nyata dengan kontrol; artinya semua kandidat probiotik yang diuji tidak menimbulkan kematian yang berarti pada udang atau tergolong tidak patogen (Widanarni *et al.* 2008a,b).

Hasil Uji Tantang Bakteri Kandidat Probiotik dengan *V. harveyi* MR5339 Rf^R pada larva udang windu

Masing-masing tiga isolat bakteri kandidat probiotik yang paling potensial berdasarkan uji *in vitro* dari metode Kirby-Bauer dan kultur bersama serta tidak bersifat patogen, diuji efektifitasnya dalam menghambat serangan *V. harveyi* MR5339 pada larva udang windu. Hasil pengujian menunjukkan bahwa semua isolat yang diuji dapat meningkatkan kelangsungan hidup larva udang. Nilai kelangsungan hidup larva pada perlakuan yang selain diinfeksi dengan *V. harveyi* MR5339 Rf^R juga ditambah probiotik adalah 76,7–90,0%, sedangkan pada perlakuan yang hanya diinfeksi dengan *V. harveyi* MR5339 Rf^R tanpa probiotik nilai kelangsungan hidupnya hanya 65,0–73,3% (Widanarni *et al.* 2008a,b). Peningkatan nilai kelangsungan hidup larva tersebut diduga disebabkan oleh penghambatan pertumbuhan *V. harveyi* pada larva udang oleh bakteri probiotik. Hasil penelitian Rengpipat *et al.* (1998b) menggunakan probiotik *Bacillus* S11 menunjukkan bahwa setelah diberi perlakuan probiotik selama 100 hari dan kemudian diuji tantang dengan *V. harveyi* selama 10 hari, nilai kelangsungan hidup udang windu mencapai 100% sedangkan pada kontrol 26%. Haryanti *et al.* (2000) melaporkan bahwa penambahan bakteri strain by-9 dengan konsentrasi 10⁶ cfu.ml⁻¹ pada media pemeliharaan larva udang windu menghasilkan tingkat kelangsungan hidup 59,3%, sedangkan pada kontrol 14,7%. Riquelme *et al.* (1997) juga melaporkan bahwa penambahan bakteri strain C30 dan SVI pada media pemeliharaan larva kerang (*Argopecten purpuratus*) secara nyata dapat meningkatkan

kelangsungan hidup larva tersebut walaupun tidak berpengaruh setelah diuji tantang dengan *V. anguillarum*. Dalam uji *in vitro* sebelumnya, diketahui isolat C30 dapat menghambat pertumbuhan *V. anguillarum* patogen, sedangkan SV1 tidak menunjukkan adanya penghambatan.

Mekanisme Aksi dan Karakterisasi Bakteri Probiotik

Uji *In Vivo* Bakteri Probiotik pada Larva Udang

Isolat yang digunakan dalam penelitian ini adalah IUb dan Ua (isolat terbaik yang dihasilkan pada penelitian Tahap I) serta SKT-b (diisolasi oleh Widanarni *et al.* 2003). Hasil pengujian menunjukkan bahwa kelangsungan hidup larva yang diinokulasi dengan *V. harveyi* dan diberi bakteri probiotik IUb, SKT-b dan Ua, berturut-turut adalah 88,33, 83,33, dan 81,67%, sedangkan perlakuan kontrol positif (hanya diinokulasi *V. harveyi* saja) sebesar 41,67% dan kontrol negatif (tanpa penambahan bakteri) sebesar 68,33% (Widanarni *et al.* 2008c).

Penggunaan Penanda Rf^R pada Bakteri Probiotik

Sebanyak 10⁸cfu.ml⁻¹ bakteri probiotik tipe liar sensitif rifampisin ditumbuhkan pada media SWC-agar yang mengandung rifampisin 50 µg.ml⁻¹, telah memberikan mutan resisten rifampisin 48–110 koloni. Morfologi koloni dan pendarannya sama seperti tipe liarnya. Sebelum digunakan pada uji mekanisme penghambatan probiotik pada larva udang, maka mutan Rf^R yang telah diperoleh ini terlebih dahulu diuji pertumbuhannya dan dibandingkan dengan tipe liarnya.

Pertumbuhan Bakteri Probiotik Rf^R

Hasil uji pertumbuhan bakteri probiotik baik tipe liar maupun yang diberi penanda resisten rifampisin (Rf^R), memberikan laju pertumbuhan yang relatif sama. Pertumbuhan tertinggi ketiga strain bakteri probiotik (IUb, SKT-b, Ua) dicapai pada jam ke 10–14, dan menurun setelahnya (Widanarni *et al.* 2008c). Hal ini menunjukkan bahwa adanya mutasi resisten rifampisin pada bakteri probiotik tidak berpengaruh terhadap pertumbuhannya. Dengan demikian penanda tersebut dapat digunakan sebagai penanda untuk memonitor keberadaan bakteri tersebut pada larva udang dan media pemeliharaannya.

Daya Hambat Bakteri Probiotik Rf^R terhadap *V. harveyi* pada Larva Udang

Tiga isolat mutan bakteri probiotik diuji efektivitasnya dalam menghambat serangan *V. harveyi* MR5339 Rf^R pada larva udang windu. Pengamatan dilakukan terhadap kelangsungan hidup larva, pertumbuhan panjang dan bobot larva serta populasi bakteri probiotik, *V. harveyi* MR5339 Rf^R dan total bakteri baik pada air pemeliharaan, udang hidup maupun udang mati.

Hasil pengujian menunjukkan bahwa ketiga isolat mutan probiotik tersebut secara signifikan ($p < 0,05$) dapat meningkatkan kelangsungan hidup larva udang seperti tipe

liarnya. Kelangsungan hidup larva pada perlakuan dengan penambahan SKT-b, IUb, dan Ua berturut-turut adalah 88,33, 86,67 dan 83,33%, sedangkan perlakuan yang hanya diinokulasi dengan *V. harveyi* MR5339 Rf^R tanpa probiotik, nilai kelangsungan hidupnya hanya mencapai 51,67% (Widanarni *et al.* 2008c). Peningkatan nilai kelangsungan hidup larva udang terjadi karena adanya penghambatan pertumbuhan *V. harveyi* pada larva udang oleh bakteri probiotik. Hal ini ditunjukkan oleh lebih tingginya jumlah sel *V. harveyi* MR5339 Rf^R pada perlakuan tanpa penambahan probiotik, dibanding pada perlakuan dengan penambahan probiotik, baik pada larva mati, larva hidup, maupun air media pemeliharaan (Widanarni *et al.* 2008c).

Larva udang yang diberi probiotik memiliki nilai pertumbuhan panjang lebih besar (5,16–5,32%) dibanding perlakuan tanpa probiotik (4,90–5,02%). Demikian pula untuk pertumbuhan bobot menunjukkan bahwa larva yang diberi probiotik menghasilkan pertumbuhan bobot lebih besar (11,27–11,99%) dibanding perlakuan tanpa pemberian probiotik (9,35–10,63%) (Widanarni *et al.* 2008c). Hal ini menunjukkan bahwa penambahan bakteri probiotik dapat meningkatkan pertumbuhan panjang dan bobot pada larva udang windu. Diduga pada perlakuan tanpa penambahan probiotik, larva udang menggunakan sebagian energi pertumbuhannya untuk mengatasi serangan *V. harveyi*, sehingga pertumbuhan panjang dan bobotnya lebih rendah dibanding perlakuan dengan penambahan bakteri probiotik. Pada perlakuan dengan penambahan probiotik, bakteri probiotik bekerja mengeliminir populasi *V. harveyi*, sehingga larva udang dapat memanfaatkan energi yang tersedia lebih banyak untuk pertumbuhannya. Selain itu, bakteri probiotik yang ditambahkan tersebut berkemungkinan mengandung makro dan mikro nutrien yang dibutuhkan larva udang atau dapat memberi kontribusi enzim untuk pencernaan yang menyebabkan udang dapat mencerna pakan lebih baik, sehingga nutrisi yang diserap oleh tubuh udang juga lebih banyak, yang akhirnya akan memberikan pertumbuhan yang lebih baik.

Identifikasi Bakteri Probiotik

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

Aplikasi Bakteri Probiotik pada Larva Udang

Aplikasi Bakteri Probiotik pada Berbagai Stadia Larva Udang

Percobaan pemberian probiotik pada berbagai stadia larva udang windu menunjukkan bahwa tingkat kelangsungan hidup larva udang adalah 24,17%–35,83% dengan nilai tertinggi terdapat pada perlakuan pemberian bakteri probiotik pada setiap pergantian stadia yaitu sebesar 35,83%, sedangkan terendah pada perlakuan kontrol (tanpa

pemberian bakteri probiotik) yaitu 24,17%. Nilai laju pertumbuhan panjang larva udang windu dengan penambahan bakteri probiotik *Vibrio* SKT-b sebesar 18,64%–19,09%, tidak berbeda nyata dengan kontrol (18,47%) (Widanarni *et al.* 2008d).

Aplikasi Bakteri Probiotik pada Berbagai Konsentrasi

Percobaan pemberian berbagai konsentrasi bakteri probiotik pada larva udang windu menunjukkan bahwa tingkat kelangsungan hidup larva udang 76,67%–94,17% dengan nilai tertinggi terdapat pada perlakuan pemberian bakteri probiotik dengan dosis 10⁴ cfu/ml yaitu sebesar 94,17%, sedangkan terendah pada perlakuan kontrol (tanpa pemberian bakteri probiotik) yaitu hanya 76,67%. Nilai laju pertumbuhan panjang larva udang windu dengan penambahan bakteri probiotik *Vibrio* SKT-b adalah 7,59%–8,26% dan tidak berbeda nyata dibandingkan dengan kontrol (7,67%) (Widanarni *et al.* 2008e).

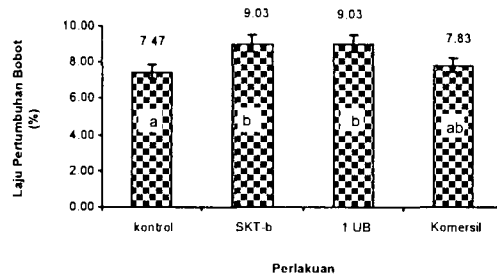
Aplikasi Bakteri Probiotik Melalui Pengayaan Artemia

Percobaan pemberian probiotik melalui pengayaan *Artemia* menunjukkan bahwa pertumbuhan panjang dan bobot larva udang windu yang diberi *Artemia* dan diperkaya dengan *Vibrio* SKT-b masing-masing adalah 5,78% dan 18,87%, berbeda sangat nyata ($p < 0,01$) dengan kontrol yang hanya diberi *Artemia* saja yaitu 4,23% dan 12,79% (Widanarni *et al.* 2008f). Hal ini menunjukkan bahwa penambahan *Vibrio* SKT-b pada *Artemia* mampu meningkatkan laju pertumbuhan panjang dan bobot larva udang windu. Kelangsungan hidup larva udang tidak berbeda nyata antara perlakuan dan kontrol; dengan nilai 80–93% untuk yang diberi pakan *Artemia* yang diperkaya dengan *Vibrio* SKT-b dan 70 hingga 80% untuk kontrol (Widanarni *et al.* 2008f).

Aplikasi Bakteri Probiotik Melalui Pakan Buatan

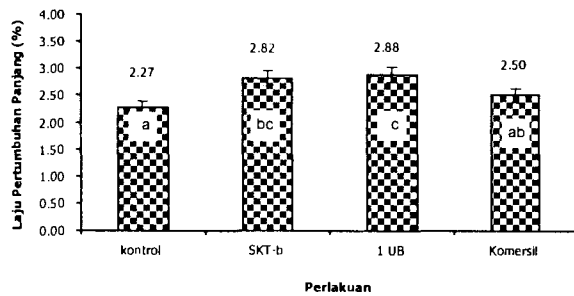
Setelah masa pemeliharaan selama 42 hari, pemberian bakteri probiotik melalui pakan menghasilkan laju pertumbuhan bobot 7,47–9,03% (Gambar 1) dan laju pertumbuhan panjang 2,27–2,88% (Gambar 2). Hasil analisa pada selang kepercayaan 95% menunjukkan bahwa

pemberian probiotik melalui pakan dapat meningkatkan pertumbuhan baik pada bobot maupun panjang. Peningkatan laju pertumbuhan bobot dan panjang tersebut terjadi karena probiotik yang diberikan dapat meningkatkan nilai nutrisi (terutama protein) pakan yang diberikan (Tabel 1). Selain itu, peningkatan pertumbuhan diduga disebabkan karena bakteri probiotik yang diberikan mengandung makro dan mikro nutrisi yang tidak terdapat pada pakan, yang



Keterangan : Huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata

Gambar 1 Laju Pertumbuhan Bobot Udang Windu yang Diberi Pakan Uji



Gambar 2 Laju Pertumbuhan Panjang Udang Windu yang Diberi Pakan Uji.

Keterangan : Huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata

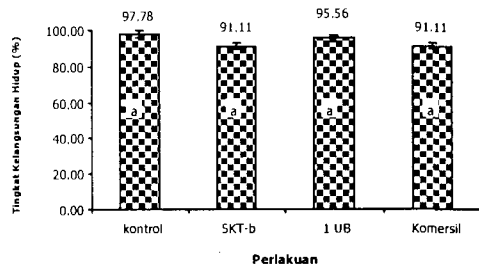
dapat memacu pertumbuhan udang. Kemungkinan lain, bakteri probiotik yang diberikan dapat memberikan kontribusi enzim untuk pencernaan yang menyebabkan udang dapat mencerna pakan dengan lebih baik, sehingga

Tabel 1 Kandungan Nutrien dalam Pakan Uji Selama Pemeliharaan Udang Windu *Penaeus monodon*

Perlakuan	Hasil Analisa Proksimat (% bobot Kering)				
	Protein	Lemak	Kadar Abu	Karbohidrat	
				Serat Kasar	BETN
Kontrol	38,50	8,13	8,97	3,78	40,62
SKT-b	46,50	8,78	7,55	2,85	34,32
1 UB	42,62	8,27	7,31	2,02	39,78
Komersil	41,56	8,54	8,78	2,00	39,12

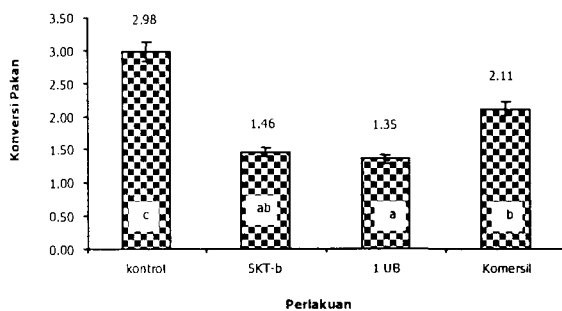
nutrisi yang dapat diserap oleh tubuh juga lebih banyak; yang akhirnya akan memberikan pertumbuhan yang lebih baik. Hal senada diutarakan oleh Johnson (1986) dalam Rengpipat *et al.* (1998b) bahwa probiotik mampu meningkatkan penyerapan pakan dalam saluran pencernaan.

Pemberian probiotik melalui pakan menghasilkan



Gambar 3 Tingkat Kelangsungan Hidup Udang Windu yang Diberi Pakan Uji

Keterangan: Huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata



Keterangan : Huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata.

Gambar 4 Konversi Pakan Udang Windu yang Diberi Pakan Uji

kelangsungan hidup 91,11–97,78% (Gambar 3) dan tidak berbeda nyata antar perlakuan yang diberikan. Kandungan nutrisi yang berubah akibat penambahan probiotik masih berada pada kisaran yang baik bagi udang windu untuk hidup. Keadaan tersebut didukung dengan kisaran kualitas air yang masih berada dalam kisaran optimal bagi pertumbuhan udang windu. Pemberian probiotik melalui pakan menghasilkan nilai konversi pakan (FCR) 1,35–2,98 (Gambar 4). Pada selang kepercayaan 95%, semua perlakuan probiotik berpengaruh nyata terhadap nilai FCR. Perlakuan pemberian probiotik yang menghasilkan nilai FCR lebih rendah dibandingkan kontrol mengindikasikan bahwa untuk menghasilkan pertumbuhan yang sama dibutuhkan jumlah pakan yang lebih sedikit pada perlakuan pemberian probiotik sehingga penggunaan pakan lebih efisien. Hal ini diduga sebagai akibat dari adanya kerja bakteri yang memperbaiki penggunaan pakan.

KESIMPULAN

Isolat probiotik yang dihasilkan yakni 1UB, SKT-b, dan Ua adalah efektif menghambat pertumbuhan *V. harveyi* dan secara signifikan dapat meningkatkan kelangsungan hidup dan pertumbuhan larva udang windu. Peningkatan kelangsungan hidup larva udang tersebut terjadi karena adanya penghambatan pertumbuhan *V. harveyi* oleh bakteri probiotik yang kemungkinan terjadi karena adanya kompetisi tempat pelekatan atau sumber nutrisi antara *V. harveyi* dengan bakteri probiotik baik pada larva udang maupun media pemeliharaannya. Bakteri probiotik yang diperoleh dapat diaplikasikan langsung pada media pemeliharaan larva udang atau melalui pengayaan pakan baik pakan alami maupun pakan buatan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada: Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, atas dana dan kepercayaan yang diberikan; seluruh anggota tim peneliti, teknisi dan mahasiswa yang terlibat dalam penelitian ini, atas kerja sama yang telah terbina selama penelitian berlangsung; Balai Pengembangan Benih Ikan Laut Payau dan Udang (BPBILAPU), Pangandaran; Hatchery Udang PT Biru Laut Khatulistiwa dan Tambak Udang Intensif, Lampung atas ijin yang diberikan untuk pengambilan contoh bakteri dan larva udang.

DAFTAR PUSTAKA

- Alabi AO, Jones DA, Latchford JW. 1999. The Efficacy of Immersion as Opposed to Oral Vaccination of *Penaeus indicus* Larvae Against *Vibrio harveyi*. *Aquaculture* 179:1-11.
- Douillet PA, Langdon CJ. 1994. Use of a Probiotics for the Culture of Larvae of the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture* 119:25-40.
- Effendie MI. 1997. *Biologi Perikanan*. Yayasan Pustaka Nusatama. Yogyakarta. 163 hal.
- Fuller, R. 1992. History and Development of Probiotics. *Di dalam: Fuller R, editor. Probiotics the Scientific Basis*. London: Chapman and Hall. hlm 1-8.
- Gram L, Melchiorson J, Spanggaard B, Huber I, Nielsen TF. 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a Possible Probiotic Treatment of Fish. *Appl. Environ Microbiol* 65:969-973.
- Gomez-Gil B, Roque A, Tumbull JF. 2000. The Use and Selection of Probiotic Bacteria for Use in the Culture of Larval Aquatic Organisms. *Aquaculture* 191:259-270.

- Haryanti, Sugama K, Tsumura S, Nishijima T. 2000. Potentiality of Bacteria Isolated from Seawater as Biological Control Agent for Vibriosis in Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon* Larvae. International Symposium on Marine Biotechnology.
- Huisman EA. 1987. Principles of Fish Production. Department of Fish Culture and Fisheries. Wageningen Agricultural University. Netherlands. 170hlm.
- Karunasagar I, Pai R, Malathi GR, Karunasagar I. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* Larvae Due to Antibiotic-Resistant *Vibrio harveyi* Infection. Aquaculture 128:203–209.
- Lavilla-Pitogo CR, Baticados MCL, Cruz-Lacierda ER, De la Pena LD. 1990. Occurrence of Luminous Bacterial Diseases of *Penaeus monodon* Larvae in the Philippines. Aquaculture 91:1–13.
- Marchesi JR *et al.* 1998. Design and Evaluation of Useful Bacterium-Specific PCR Primers that Amplify Genes Coding for Bacterial 16S rRNA. Appl Environ Microbiol 62:2501–2507.
- Muliani, Suwanto A, Hala Y. 2003. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asal Laut Sulawesi untuk Biokontrol Penyakit Vibriosis pada Larva Udang Windu (*Penaeus monodon* Fab.). Hayati 10:6–11.
- Ohhira I, Tamura T, Fujii N, Inagaki K, Tanaka H. 1996. Antimicrobial Activity Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in the Culture Broth of *Enterococcus faecalis* TH10, an Isolate from Malaysian Fermentation Food, Temph. Japanese J Dairy and Food Sci 45:93–96.
- Rengpipat SS, Rukpratanporn S, Piyatiratitivorakul S, Menaveta P. 1998a. Probiotic in Aquaculture: A Case Study of Probiotics for Larvae of Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*). Di dalam: Flegel TW, editor. Advances in Shrimp Biotechnology. Proceedings to the Special Session on Shrimp Biotechnology, 5th Asian Fisheries Forum; Chiangmai, Thailand. Bangkok: National Center for Genetic Engineering and Biotechnology. hlm 176–181.
- Rengpipat SS, Rukpratanporn S, Piyatiratitivorakul S, Menaveta P. 1998b. Effects of a Probiotic Bacterium on Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon* Survival and Growth. Aquaculture 167:301–313.
- Rengpipat SS, Rukpratanporn S, Piyatiratitivorakul S, Menaveta P. 2000. Immunity Enhancement in Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) by a Probiotic Bacterium (*Bacillus* S11). Aquaculture 191:271–288.
- Riquelme C *et al.* 1997. Potential Probiotic Strains In The Culture of the Chilean Scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). Aquaculture 154:17–26.
- Ruangpan L. 1998. Luminous Bacteria Associated with Shrimp Mortality. Di dalam: Flegel TW, editor. Advances in Shrimp Biotechnology. Proceedings to the Special Session on Shrimp Biotechnology, 5th Asian Fisheries Forum; Chiangmai, Thailand. Bangkok: National Center for Genetic Engineering and Biotechnology. hlm 205–211.
- Skjermo J, Vadstein O. 1999. Techniques for Microbial Control in the Intensive Rearing of Marine Larvae. Aquaculture 177:333–343.
- Suwanto A, Yuhana M, Herawaty E, Angka SL. 1998. Genetic Diversity of Luminous *Vibrio* Isolated from Shrimp Larvae. Di dalam: Flegel TW, editor. Advances in Shrimp Biotechnology. Proceedings to the Special Session on Shrimp Biotechnology, 5th Asian Fisheries Forum; Chiangmai, Thailand. Bangkok: National Center for Genetic Engineering and Biotechnology. hlm 217–224.
- Teo JWP, Suwanto A, Poh CL. 2000. Novel β -lactamase Genes from Two Environmental Isolates of *Vibrio harveyi*. Antimicrob Agents Chemother 44:1309–1314.
- Tjahjadi MR, Angka SL, Suwanto A. 1994. Isolation and Evaluation of Marine Bacteria For Biocontrol of Luminous Bacterial Diseases in Tiger Shrimp Larvae (*Penaeus monodon* Fab.). Aspac J Mol Biol Biotechnol 2:234–352.
- Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W. 2000. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. Microbiol Mol Biol Rev 64:655–671.
- Widanarni, Suwanto A, Sukenda, Lay BW. 2003. Potency Of *Vibrio* Isolates for Biocontrol of Vibriosis in Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) Larvae. Biotropia 20: 11–23.
- Widanarni, F Rajab, Sukenda, M Setiawati. 2008a. Isolasi dan Seleksi Bakteri Probiotik dari Lingkungan Tambak dan Hatchery untuk Pengendalian Penyakit Vibriosis pada Larva Udang Windu *Penaeus monodon* (*in press* pada Jurnal Riset Akuakultur).
- Widanarni, I Tepu, Sukenda, M Setiawati. 2008b. Seleksi Bakteri Probiotik untuk Biokontrol Vibriosis pada Larva Udang Windu (*Penaeus monodon*) Menggunakan Cara Kultur Bersama (*in press* pada Jurnal Riset Akuakultur).
- Widanarni, Eva Ayuzar, Sukenda. 2008c. Mekanisme Penghambatan Bakteri Probiotik Terhadap Pertumbuhan *Vibrio Harveyi* pada Larva Udang Windu

- (*Penaeus monodon*). Jurnal Akuakultur Indonesia 7:181–190.
- Widanarni, MS Arifin, Sukenda. 2008d. Pengaruh Pemberian Bakteri Probiotik *Vibrio* SKT-b pada Stadia yang Berbeda terhadap Kelangsungan Hidup Larva Udang Windu *Penaeus monodon* (in press pada Jurnal Akuakultur Indonesia).
- Widanarni, MA Lidaenni, D Wahjuningrum. 2008e. Pengaruh Pemberian Bakteri Probiotik *Vibrio* SKT-b dengan Dosis yang Berbeda terhadap Kelangsungan Hidup dan Pertumbuhan Larva Udang Windu *Penaeus monodon* (in press pada Jurnal Akuakultur Indonesia)
- Widanarni, Elly, DT Sulistyowti, A Suwanto. 2008f. Pemberian Bakteri Probiotik *Vibrio* SKT-b pada Larva Udang Windu Melalui Pengayaan *Artemia*. Jurnal Akuakultur Indonesia 7: 129–137.