

**POTENSI ANTAGONISTIK ISOLAT BAKTERI *Indigenus*
MANGROVE TERHADAP *Vibrio harveyi***

**LAPORAN SKRIPSI
BUDIDAYA PERAIRAN**

**OLEH :
NILA TRI PURNAMA
NIM. 0410850058**



UNIVERSITAS BRAWIJAYA

FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

MALANG

2009

**POTENSI ANTAGONISTIK ISOLAT BAKTERI *Indigenous* MANGROVE
TERHADAP *Vibrio harveyi***

**LAPORAN SKRIPSI
BUDIDAYA PERAIRAN**

**OLEH :
NILA TRI PURNAMA**

NIM. 0410850058

DOSEN PENGUJI I

(Dr. Ir. MAFTUCH, MS)

Tanggal:

DOSEN PENGUJI II

(ATING YUNIARTI, SPi)

Tanggal:

**MENYETUJUI,
DOSEN PEMBIMBING I**

(Ir. ARNING WILUJENG E, MS)

Tanggal:

DOSEN PEMBIMBING II

(Dra. UMI MARWATI, M.Si)

Tanggal:

**MENGETAHUI,
KETUA JURUSAN**

(Ir. MAHENO SRIWIDODO, MS)

Tanggal:



KATA PENGANTAR

Puji Syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulisan laporan skripsi ini dapat terselesaikan. Laporan ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana perikanan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Malang. Perkenankan penulis menghaturkan ucapan terima kasih kepada para pihak berikut :

- Allah SWT yang telah memberikan limpahan rahmat dan hidayahnya.
- Ibunda dan Ayahanda serta kedua kakak yang terkasih dan tercinta.
- Ir. Arning Wilujeng Ekawati MS dan Dra. Umi Marwati Msi yang telah sabar memberikan bimbingan dan masukan hingga penulis dapat menyelesaikan penulisan dengan cepat dan optimal.
- Semua pihak yang tak disebutkan satu persatu, terimakasih atas doanya, kasih sayang dan waktunya.

Penulis menyadari sebagai manusia mempunyai keterbatasan dan kemampuan, maka laporan ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu berbagai saran dan kritik sangat penulis harapkan. Akhir kata penulis berharap semoga karya tulis ini bermanfaat dan dapat memberikan informasi bagi semua pihak yang memerlukan.

Malang, 17 April 2008

Penulis

RINGKASAN

NILA TRI PURNAMA. Potensi Antagonistik Isolat Bakteri *Indigenous* Mangrove terhadap *Vibrio harveyi* (di bawah bimbingan **Ir. ARNING WILUJENG EKAWATI, MS** dan **Dra. UMI MARWATI, MSi**).

Budidaya udang merupakan salah satu produksi unggulan pada sektor perikanan yang menjadi sumber devisa terbesar bagi Negara Indonesia. Hal tersebut ditunjukkan oleh kenaikan angka produksi udang yang terus-menerus mengalami peningkatan. Peningkatan produksi tersebut mengakibatkan munculnya berbagai macam teknologi budidaya di kalangan pengusaha tambak udang. Sejalan dengan perkembangan teknologi budidaya udang secara intensif muncul berbagai masalah dan hambatan yang dapat menyebabkan kegagalan panen dan menurunnya produksi udang budidaya. Kegagalan tersebut disebabkan oleh faktor-faktor antara lain: faktor fisik, kimiawi dan biologis. Faktor biologis seperti penyakit merupakan salah satu kendala produksi yang paling banyak menimbulkan kerugian secara ekonomis. Salah satu jenis penyakit penyebab kematian dalam usaha budidaya udang adalah penyakit Vibriosis. *Vibrio harveyi* merupakan salah satu penyebab utama penyakit ini. *Vibrio harveyi* adalah bakteri laut bercahaya, termasuk gram negatif, organisme patogen utama dalam budidaya udang windu dan juga menginfeksi pada ikan. Penanggulangan penyakit vibriosis dapat dilakukan dengan cara pemberian beberapa obat-obatan. Sayangnya obat-obatan (antibiotik) tersebut mempunyai dampak negatif yaitu menyebabkan resistensi dan menimbulkan masalah residu obat pada udang. Oleh karena itu, perlu adanya upaya alternatif dalam penanggulangan penyakit dengan menggunakan bakteri antagonis, yang diambil dari kawasan mangrove.

Ekosistem mangrove sangat kaya akan berbagai macam bakteri sehingga jumlah bakteri di dalam mangrove lebih besar jumlahnya dibandingkan dengan fungi. Kesuburan air mangrove berasal dari dekomposisi mikrobial bahan organik yang kaya akan protein. Diharapkan dari penelitian ini isolasi bakteri *indigenious* mangrove dapat diaplikasikan sebagai kandidat probiotik yang antagonis terhadap bakteri *Vibrio harveyi*.

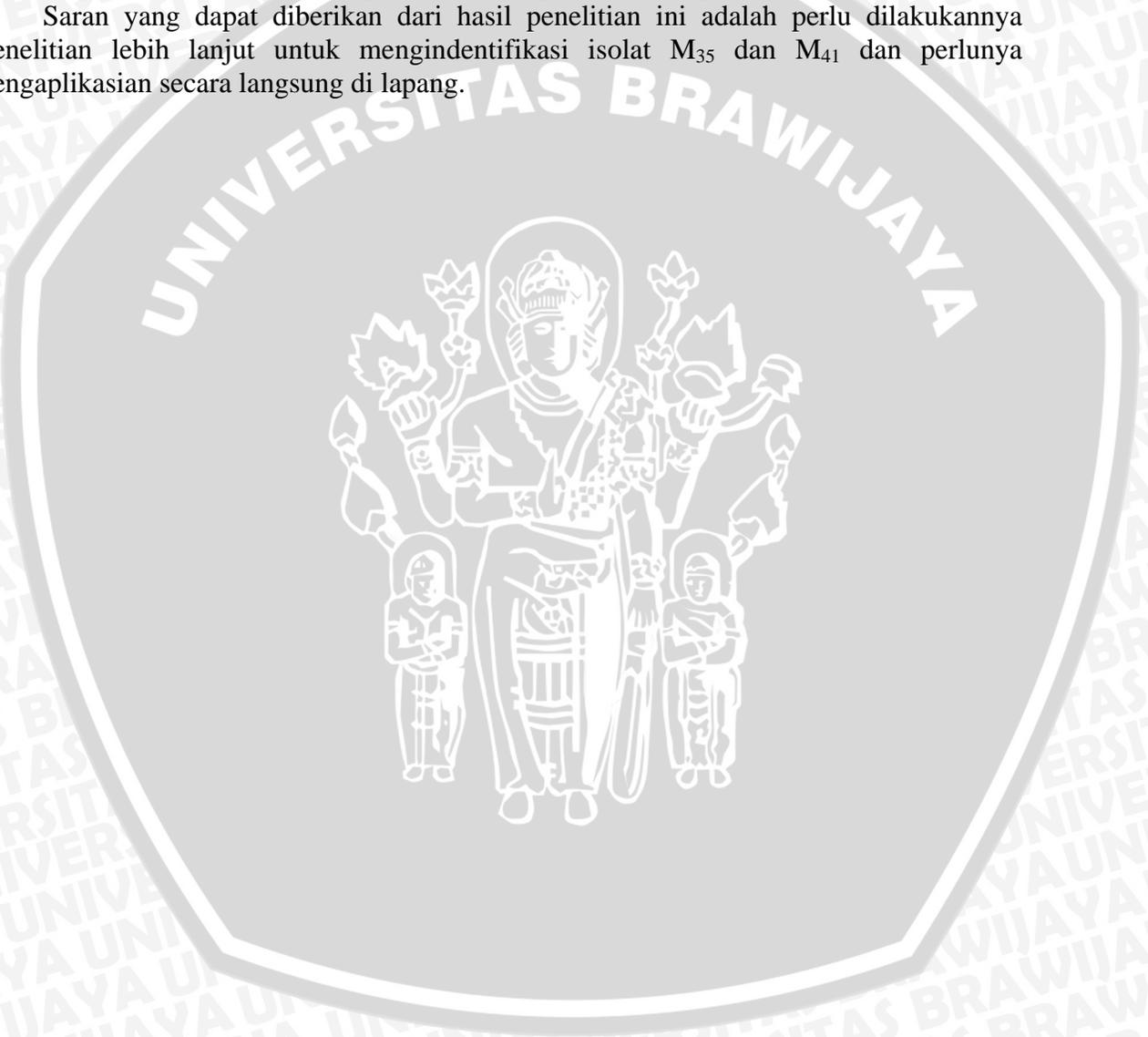
Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya, pada bulan Juni-Januari 2008. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui karakteristik bakteri *indigenious* mangrove dan mengetahui potensi isolat M₃₅ dan M₄₁ dalam menghambat *Vibrio harveyi*. Hasil penelitian yang berupa isolat M₃₅ dan M₄₁ *indigenious* mangrove diharapkan dapat digunakan sebagai kandidat probiotik yang antagonis terhadap bakteri *Vibrio harveyi*.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode deskriptif. Metode deskriptif adalah akumulasi data dasar dalam cara deskriptif semata-mata tidak perlu menerangkan saling hubungan, membuat ramalan, atau mendapatkan makna dan implikasi. Analisis data secara deskriptif yaitu meliputi pengamatan morfologi koloni, uji biokimia, uji daya hambat.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolasi bakteri yang diambil dari sampel air pada kawasan mangrove Kelurahan Ketapang, Kecamatan Kademangan, Kota

Probolinggo di dapatkan sebanyak empat puluh delapan isolat. Empat puluh delapan isolat tersebut yang mempunyai daya hambat terhadap bakteri *Vibrio harveyi* yaitu hanya isolat M₃₅ dan M₄₁. Isolat M₃₅ dan M₄₁ mempunyai bentuk circular (bulat), elevasi low convex (sedikit cembung), tepi entire (rata), struktur dalam opaque (tidak tembus cahaya) dan berwarna putih. Isolat M₄₁ dapat menghambat bakteri *Vibrio harveyi* pada kepadatan 2×10^6 sampai 2×10^8 , masing-masing mempunyai index zona hambat berturut-turut yaitu 1,79 ; 3,16 dan 5,83. Isolat M₃₅ hanya bisa menghambat bakteri *Vibrio harveyi* pada kepadatan 2×10^8 dengan index zona hambat sebesar 2,33. Isolat M₃₅ dan M₄₁ merupakan kelompok gram negatif, berbentuk batang, *Methyl Red* negatif, *Voges Proskauer* negatif, katalase positif, sitrat simmon negatif, Motilitas positif, Endospora Positif.

Saran yang dapat diberikan dari hasil penelitian ini adalah perlu dilakukannya penelitian lebih lanjut untuk mengidentifikasi isolat M₃₅ dan M₄₁ dan perlunya pengaplikasian secara langsung di lapang.



DAFTAR ISI

	Halaman
RINGKASAN	i
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
DAFTAR ISTILAH	xi
I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.5 Hipotesis	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Kawasan Mangrove.....	5
2.2 Bakteri <i>Vibrio harveyi</i>	7
2.2.1 Morfologi <i>Vibrio harveyi</i>	7
2.2.2 Habitat dan Penyebaran.....	8
2.3.3 Metabolisme dan Pertumbuhan	9
2.4.4 Mekanisme Serangan <i>Vibrio harveyi</i>	10
III. MATERI DAN METODE PENELITIAN	
3.1 Tempat Penelitian.....	14
3.2 Bahan dan Alat.....	14
3.2.1 Bahan	14
3.2.2 Alat	14
3.3 Prosedur Penelitian	14
3.3.1 Pengambilan Sampel.....	14
3.3.2 Isolasi, Karakterisasi Morfologi koloni dan Purifikasi	15
3.3.3 Uji Daya Hambat terhadap Densitas <i>Vibrio harveyi</i>	16
3.3.4 Karakteristik Isolat M ₃₅ dan M ₄₁ Bakteri <i>Indigenius</i> Mangrove.....	17
3.4 Metode Penelitian	20

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

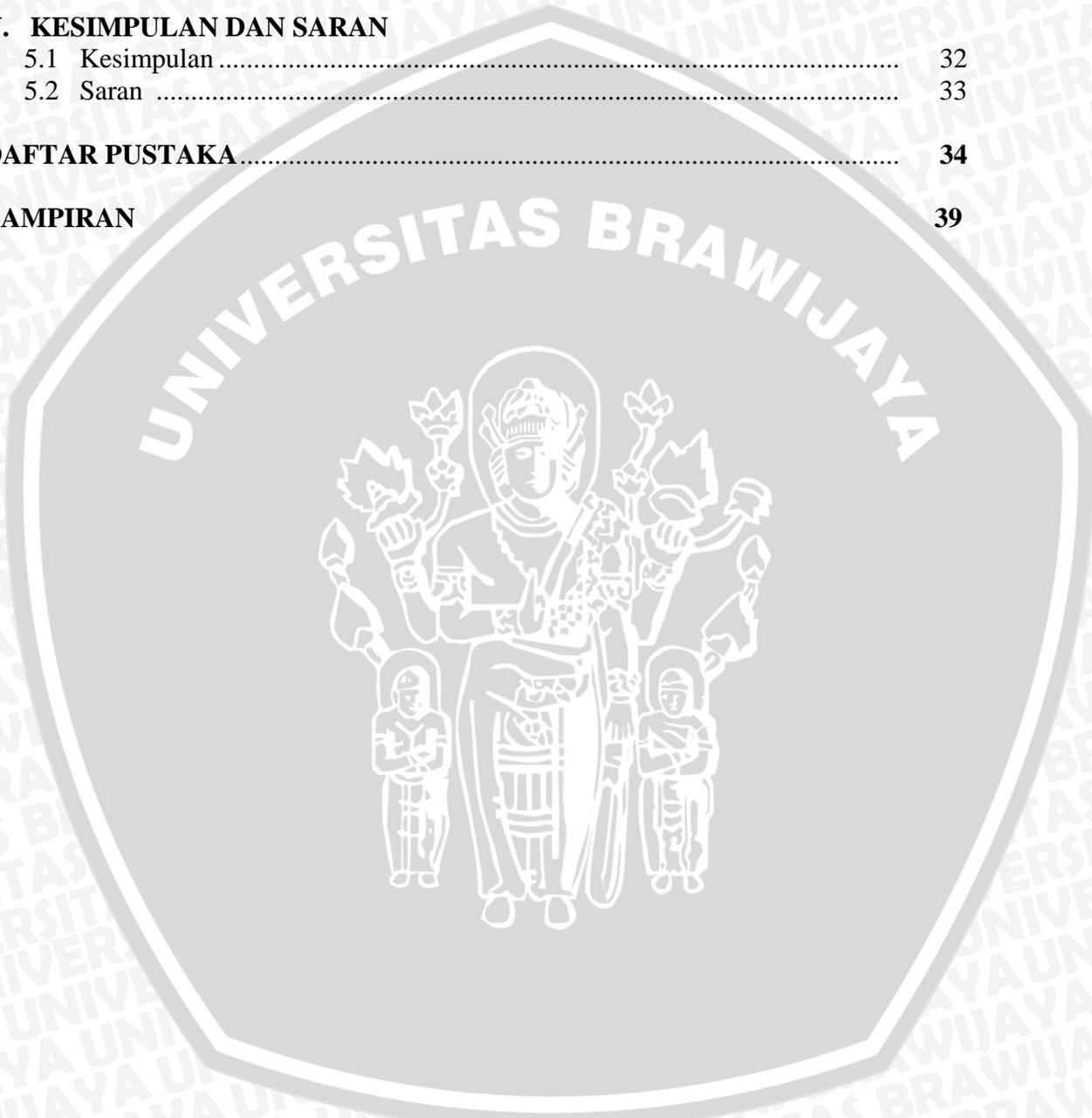
4.1 Isolasi dan Karakteristik Koloni Bakteri <i>Indigenious</i> Mangrove	22
4.2 Uji Hambat Isolat-Isolat Bakteri <i>Indigeneus</i> Mangrove terhadap Densitas Bakteri <i>Vibrio harveyi</i>	25
4.3 Karakteristik Fisiologis dan Biokimia.....	28

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan	32
5.2 Saran	33

DAFTAR PUSTAKA	34
-----------------------------	-----------

LAMPIRAN	39
-----------------	-----------



DAFTAR ISTILAH

Istilah	Keterangan
Circular	Bentuk bulat
Convex	Elevasi cembung
Crenate	Tepian seperti kulit durian
Curled	Melengkung
Effuse	Elevasi pertumbuhan tipis, biasanya merata.
Entire	Tepian rata
Filamentous	berfilamen
Finely granular	Struktur keruh tak berserabut
Irregulair	Bentuk bergelombang
Light-Yellow	Krem
Low convex	Elevasi sedikit cembung
Opaque	Struktur dalam tidak tembus cahaya
Rhizoid	Bentuk pertumbuhan dengan cabang-cabang tidak beraturan atau seperti susunan akar
Smoath	Struktur lembut atau keruh seperti susu
Translucent	Struktur dalam sedikit tembus cahaya
Transparent	Struktur dalam tembus cahaya
Undulate	Tepian bergelombang
White	Putih
Yellow	Kuning

(Jutono, 1976)

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Budidaya udang merupakan salah satu produksi unggulan pada sektor perikanan yang menjadi sumber devisa terbesar bagi Negara Indonesia. Negara-negara yang menjadi pengimpor utama produksi udang di Indonesia adalah Negara Jepang, Amerika Serikat dan Negara-negara Eropa (Gunarto, 2006). Hal tersebut ditunjukkan oleh kenaikan angka produksi udang yang terus-menerus mengalami peningkatan. Ferinaldy, (2008) merincikan bahwa pada tahun 2005 produksi udang mencapai 280.629 ton; tahun 2006 mencapai 327.610 ton; tahun 2007 mencapai 352.220 ton; pada tahun 2008 di perkirakan mencapai 470.000 ton dan pada tahun 2009 di perkirakan mencapai 540.000 ton.

Peningkatan produksi tersebut mengakibatkan munculnya berbagai macam teknologi budidaya di kalangan pengusaha tambak udang. Teknologi yang sering diaplikasikan ke dalam kegiatan budidaya tersebut adalah sistem budidaya udang secara intensif. Kelebihan budidaya udang secara intensif adalah masa produksi yang relatif singkat dengan keuntungan yang besar. Menurut Broks *et al.* (1994) budidaya udang secara intensif adalah budidaya udang yang menerapkan sistem teknologi modern (seperti: kincir air, genset, pompa air), padat penebaran tinggi dengan dosis pakan yang tinggi.

Sejalan dengan perkembangan teknologi budidaya udang secara intensif muncul berbagai masalah dan hambatan yang dapat menyebabkan kegagalan panen dan menurunnya produksi udang budidaya. Kegagalan tersebut disebabkan oleh faktor-faktor antara lain: faktor fisik, kimiawi dan biologi. Faktor fisik berasal dari penanganan

tambak yang melampaui daya dukung lingkungannya sehingga kualitas air tambak mengalami penurunan. Faktor kimiawi terjadi karena proses pembusukan bahan organik berupa sisa pakan dan kotoran udang yang dapat mengakibatkan turunnya pH pada tambak. Faktor biologi disebabkan oleh penyakit antara lain: fungi, virus dan bakteri.

Dari beberapa faktor tersebut di atas, faktor biologis merupakan salah satu kendala produksi yang paling banyak menimbulkan kerugian secara ekonomis. Penyakit yang sering menyerang udang pada stadia larva adalah *Vibrio harveyi*. Menurut Zhong *et al.* (2006), *Vibrio harveyi* adalah bakteri laut bercahaya, termasuk gram negatif, organisme patogen utama dalam budidaya udang windu dan juga menginfeksi pada ikan. Menurut Prajitno (2007), mekanisme penyerangan bakteri *Vibrio Harveyi* yaitu melalui mulut masuk ke organ pencernaan dan akhirnya menyerang hepatopankreas sampai hancur. Insang yang terinfeksi juga disebabkan wabah penyakit dari luar yang masuk ke dalam tubuh udang windu bersama dengan air masuk ke lamella insang kemudian melalui kapiler darah dan akan merusak jaringan sekitarnya serta merusak organ hepatopankreas sehingga menyebabkan kematian pada udang.

Tingkat patogenesis bakteri ditentukan oleh suatu mekanisme dalam proses pertumbuhan. Suatu mekanisme yang umum untuk mengontrol kepadatan populasi bakteri gram negatif adalah dengan menghambat komunikasi antar sel (Rozi, 2008). Menurut Suwanto (2002), penghambatan komunikasi itu dapat terjadi antara lain karena senyawa atau mikroorganisme tertentu yang menghambat kerja *acyl homoserine lactone* (AHL) atau ekspresi gen-gen yang dipengaruhi oleh *quorum sensing*. Senyawa itu dapat berupa prebiotik, dan mikroorganismenya dapat berupa probiotik

Menurut Muliani (2006), bakteri yang pathogen terhadap bakteri *Vibrio harveyi* antara lain: kelompok bakteri *bacillus firmus*, *Brevibacillus laterosporus* dan

Psychrobacter sp. Bakteri-bakteri tersebut dapat dijadikan suatu probiotik. Penggunaan bakteri probiotik merupakan usaha penanggulangan penyakit pada udang yang paling banyak digunakan oleh para pembudidaya (Haryanti *et al.*, 2001; Irianto, 2003; Muliani *et al.*, 2004; Panigrahi *et al.*, 2005). Penggunaan bakteri probiotik di tambak harus dilakukan secara hati-hati, karena setiap jenis bakteri probiotik memiliki perbedaan persyaratan untuk hidup dan tumbuh. Menurut Poernomo (2004), bakteri probiotik yang diaplikasikan ke tambak harus mampu hidup, tumbuh, berkembang biak dan mampu bekerja secara aktif sesuai dengan harapan.

Sumber mikroba yang digunakan dalam penelitian ini adalah air kawasan mangrove. Sumber isolat tersebut dipilih karena kawasan mangrove memiliki diversitas yang tinggi. Menurut Purushothaman and Jayalakshmi (2000), ekosistem mangrove sangat kaya akan berbagai macam bakteri sehingga jumlah bakteri di dalam mangrove lebih besar dibandingkan dengan fungi. Kesuburan air mangrove berasal dari dekomposisi mikrobial bahan organik yang kaya akan protein. Diharapkan dari penelitian ini isolasi bakteri indigenous mangrove dapat diaplikasikan sebagai kandidat probiotik yang antagonis terhadap bakteri *Vibrio harveyi*.

1.2 Perumusan Masalah

Permasalahan yang dibahas pada penelitian ini adalah :

1. Bagaimanakah karakteristik bakteri *indigenous* mangrove Kelurahan Ketapang, Kecamatan Kademangan, Kota Probolinggo?
2. Bagaimanakah bakteri *indigenous* mangrove Kelurahan Ketapang, Kecamatan Kademangan, Kota Probolinggo mampu menghambat *Vibrio harveyi*?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk :

1. Mengetahui karakteristik bakteri *indigenous* mangrove Kelurahan Ketapang, Kecamatan Kademangan, Kota Probolinggo
2. Mengetahui potensi antagonis bakteri *indigenous* mangrove Kelurahan Ketapang, Kecamatan Kademangan, Kota Probolinggo dalam menghambat *Vibrio harveyi*

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian yang berupa isolat bakteri *indigenous* mangrove Kelurahan Ketapang, Kecamatan Kademangan, Kota Probolinggo diharapkan dapat digunakan sebagai kandidat probiotik yang antagonis terhadap bakteri *Vibrio harveyi*.

1.5 Hipotesis

H₀ : Diduga uji bakteri *indigenous* mangrove mampu menghambat bakteri *Vibrio harveyi*.

H₁ : Diduga uji bakteri *indigenous* mangrove tidak mampu menghambat bakteri *Vibrio harveyi*.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kawasan Mangrove

Ekosistem mangrove adalah suatu ekosistem peralihan antara daratan dengan ekosistem laut yang biasanya berada di daerah muara sungai atau estuarin. Kawasan ini merupakan daerah tujuan akhir dari partikel-partikel organik ataupun endapan lumpur yang terbawa dari daerah hulu akibat adanya erosi. Dengan demikian, daerah mangrove merupakan daerah yang subur, baik daratannya maupun perairannya, karena selalu terjadi transportasi nutrien akibat adanya pasang Surut (Souzan *et al.*, 2006).

Kawasan mangrove mempunyai berbagai fungsi. Fungsi fisiknya yaitu untuk menjaga kondisi pantai agar tetap stabil, melindungi tebing pantai dan tebing sungai, mencegah terjadinya abrasi dan intrusi air laut, serta sebagai perangkap zat pencemar. Fungsi biologis mangrove adalah sebagai habitat benih ikan, udang, dan kepiting untuk hidup dan mencari makan, sebagai sumber keanekaragaman biota akuatik dan nonakuatik seperti burung, ular, kera, kelelawar, dan tanaman anggrek, serta sumber plasma nutfah. Mangrove mengangkut nutrien dan detritus ke perairan pantai sehingga produksi primer perairan di sekitar mangrove cukup tinggi dan penting bagi kesuburan perairan. Dedaunan, ranting, bunga, dan buah dari tanaman mangrove yang mati dimanfaatkan oleh makrofauna, misalnya kepiting sesarmid, kemudian didekomposisi oleh berbagai jenis mikroba yang melekat di dasar mangrove dan secara bersama-sama membentuk rantai makanan. Detritus selanjutnya dimanfaatkan oleh hewan akuatik yang mempunyai tingkatan lebih tinggi seperti bivalvia, gastropoda, berbagai jenis juvenil ikan dan udang, serta kepiting (Gunarto, 2004).

Selain itu menurut *Convention on Biological Diversity* (1998), kawasan mangrove memiliki berbagai jenis mikroorganisme karena kaya akan bahan-bahan organik dari daun-daun mangrove yang gugur. Daun-daun mangrove mengandung banyak serat yang dapat menumbuhkan bakteri dan organisme yang telah mati mengandung banyak protein yang dapat menjadi substrat untuk tumbuhnya berbagai macam bakteri. Menurut Ahmed, *et al.* (2003) bakteri mangrove dilaporkan mempunyai toleransi salinitas yang tinggi sehingga dapat tumbuh pada level tekanan osmotik yang tinggi dengan kemampuan itu maka bakteri mangrove dapat beradaptasi dengan lingkungan sekitar. Agung (2007) juga menyatakan bahwa sebagian besar tumbuhan mangrove memiliki akar napas yang berfungsi untuk mengatur suplai O₂ dan sebagai alat untuk menyesuaikan diri dengan lingkungan. Akar napas tersebut adalah salah satu faktor yang menyebabkan tanaman mangrove dapat hidup di perairan yang memiliki salinitas yang cukup tinggi.

Mahasneh (2001) menyatakan bahwa presentase jenis bakteri yang terdapat pada air mangrove adalah bakteri proteolitik dengan persentase 21,86 %; amyolytic dengan persentase 30,32 %; cellulolytic dengan persentase 20,70 %; lipolytic dengan persentase 3,45 %. Gupta dan Basak (2007) melaporkan bahwa pada area Bhitarkanika mangrove di pulau Orissa terdapat total 567 isolat bakteri yang di isolasi. Hal tersebut membuktikan bahwa kawasan mangrove terdapat berbagai macam mikroba di dalamnya.

Mangrove juga memproduksi banyak komponen bioaktif yang dapat digunakan untuk bakterisida. Suryati *et al.* (2003), menemukan bahwa salah satu spesies mangrove yaitu *Excoecaria agallocha* mengandung bakterisida yang efektif terhadap *Vibrio mimicus* dan *Vibrio splendidus* dan tersuspensi menjadi komponen peptida. Di antara

mangrove yang tumbuh di perairan, ada 8 spesies mangrove (Tabel 1) mengandung bioaktif yang secara efektif dapat memperlambat pertumbuhan bakteri.

Tabel 1. Kandungan bioaktif dari vegetasi mangrove (Suryati *et al.*, 2003)

Spesies mangrove	Bioaktif	Spesies target
<i>Avicenia alba</i>	Cyclohexasiloxane	<i>Vibrio leigonathy</i>
<i>Acanthus ilicifolius</i>	2-methyl piperazine	<i>V.costicola, V.mimicus</i>
<i>Carbera manghas</i>	Furanon gamma- crotonolaktone	<i>V.splendidus, methchicovi</i>
<i>Clerodendrom inerme</i>	Unidentified	<i>Vibrio leigonaty</i>
<i>Eupatorium inulifolium</i>	n-decane/isodecane	<i>V.splendidus, methchicovi</i>
<i>Excoecaria agallocha</i>	Cyclohexasiloxane	<i>V.splendidus, V.mimicus</i>
<i>Osbornia octodonta</i>	2-heptamine-6 methyl-amino-6	<i>V.harveyi, V. Leigonathy</i>
<i>Soneratia caseolaris</i>	L-galactopyranocide	<i>V.harveyi, V. leigonathy</i>

2.2 Bakteri *Vibrio harveyi*

2.2.1 Morfologi *Vibrio harveyi*

Genus *vibrio* bersifat gram negatif berbentuk batang lurus atau bengkok (kurva) dengan ukuran 0,5-0,3 μm x 1,4-2,6 μm . *Vibrio* tidak membentuk spora dan bergerak dengan flagel monotrik atau multitrik pada ujung sel. Semua jenis *Vibrio* bersifat fakultatif anaerob dan kemoorganotrof serta sebagian besar bersifat oksidatif positif. Bentuk koloni halus, bulat cembung, berwarna krem dan akan tampak selama inkubasi 48 jam pada 20°C dalam media non selektif (Hjeltnes dan Roberts, 2001). Menurut Feliatra (1999), bakteri ini bersifat gram negatif, fakultatif anaerobik, fermentatif, menghasilkan katalase dan oksidase, serta bergerak dengan satu flagella pada ujung sel.

Koloni *Vibrio harveyi* tampak bulat kecil (diameter 2-5mm) dan berwarna kuning yang menunjukkan adanya fermentasi cellobiosa. Dinding sel bakteri gram negatif menunjukkan adanya bahan aromatik dan asam amino yang mengandung sulfur, arginin dan prolin serta lapisan lemak lebih tebal daripada bakteri gram positif (Harris *et al.*, 1998). *Vibriosis* disebabkan oleh bakteri *Vibrio harveyi* yaitu bakteri patogen yang

dapat menyebabkan kematian pada larva dan pada fase pertumbuhan dari budidaya crustacean (Rattanachuay *et al.*, 2007). Gejala yang ditimbulkan oleh bakteri *Vibrio harveyi* yaitu nafsu makan yang berkurang, pertumbuhan yang lambat, tingkat kematian lebih tinggi, dan terinfeksi tubuhnya udang oleh bakteri bercahaya (Okano *et al.*, 2007).

Menurut Najiah (2008), beberapa hal yang membedakan *Vibrio harveyi* dengan spesies vibrio lain, yaitu kapsulnya dapat mensintesis flagella lateral pada media padat; dapat tumbuh pada suhu 35°C; positif dalam pemanfaatan D-mannosa, Cellobiose, D-gluconate, D-glucuronate, heptanoate, α -ketoglutarate, L-serine, L-glutamate dan L-tirosin; negatif terhadap arginine dihidrolase, acetone oxybutyrate, D-sorbitol, ethanol, L-leusin, γ amino butiric acid dan putrescine. Kandungan G+C pada DNANYA berkisar dari 46 sampai 48 mol %.

2.2.2 Habitat dan Penyebaran

Bakteri *Vibrio* spp termasuk bakteri kemoorganotropik, yaitu mikroba yang dapat menggunakan komponen organik sebagai sumber karbon dan energi (Dwijoseputro, 1998). Menurut Irianto (2003), *Vibrio* merupakan genus yang dominan pada lingkungan air payau dan estuarin.

Bakteri *Vibrio* spp termasuk jenis bakteri halofit, yaitu bakteri yang dapat hidup pada salinitas tinggi. Habitat *Vibrio* spp ditemukan di sepanjang pantai utara Jawa, mulai dari pantai Tuban (Bulu, Bancar, Jenu, Palang), Gresik (Sedayu, Manyar), Sidoarjo, Bangil (Raci), Probolinggo, Karang Tekok (Situbondo), Banyuwangi (Suri Tani Pemuka), setiap muncul kasus penyakit *Vibrio*, salinitas rata-rata lebih dari 25 ppt (Prajitno, 2005).

2.2.3 Metabolisme dan Pertumbuhan

Vibrio sp. tergolong bakteri gram negatif yang bersifat anaerobik fakultatif. Dimana metabolisme bisa dilakukan dengan oksigen ataupun tanpa oksigen. Selain itu bakteri ini dapat tumbuh dengan baik pada media mineral yang mengandung ammonium, karbon sederhana dan glutamat (Andayani, 2005).

Hjeltnes dan Roberts (2001) menjelaskan bahwa dari fermentasi karbohidrat oleh bakteri *Vibrio* dihasilkan asam tetapi tidak menghasilkan gas. *Vibrio* juga menghasilkan 3-butanadiol, mereduksi nitrat serta menghasilkan berbagai macam enzim yaitu katalase, oksidase, β -galaktosidase dan arginin dihidrolase.

Brooks *et al.* (2005), menyatakan bahwa pertumbuhan adalah peningkatan secara teratur jumlah semua komponen suatu organisme. Multiplikasi sel merupakan akibat dari pertumbuhan; pada organisme uniseluler, pertumbuhan mengarah pada peningkatan dalam jumlah individu-individu yang menghasilkan suatu populasi atau kultur. Bakteri dapat bertahan hidup, tumbuh dan berkembang pada batas suhu tertentu. Suhu optimum untuk pertumbuhan bakteri *Vibrio spp.* berkisar antara 30-35°C. Kisaran salinitas yang baik untuk dapat berkembang yaitu antara 20-35 ppt serta pH optimumnya untuk dapat tumbuh berkisar antara 7,5-8,5 (Bauman dan Lee, 1984 dalam Prajitno 2007). Pada suhu 4°C dan 45°C bakteri tersebut tidak tumbuh dan pada suhu 55°C akan mati (Prajitno, 2007).

Pada umumnya *Vibrio* dapat tumbuh dengan baik dan cepat dalam medium kultur standar. Medium yang dapat digunakan untuk kultur *Vibrio* antara lain : ORI yang mengandung 0,1 % pepton, 0,2 % protease, dan 0,2 % ekstrak khamir. CEY yang mengandung 20 gram/liter asam casamino, 6 gram/liter ekstrak khamir, dan 2,5

gram/liter NaCl; medium NaCl tanpa nutrisi agar; medium TGY (*Tryptone Glucose Yeast*); 10 medium BHI (*Broth Heart Infusion*), TSA (*Tryptic Soy Agar*), TSB (*Tryptic Soy Broth*), NA (*Nutrient Agar*), NB (*Nutrient Broth*), serta medium TCBS (Agung, 2007).

2.2.4 Mekanisme Serangan *Vibrio harveyi*

Vibrio merupakan penyebab utama penyakit udang menyala dan dapat berperan sebagai patogen primer ataupun patogen sekunder. Sebagai patogen primer, *Vibrio* masuk melalui kontak langsung dengan organisme; sedangkan sebagai patogen sekunder, *Vibrio* menginfeksi organisme yang telah terlebih dahulu terinfeksi penyakit lain. Penyakit udang menyala ini pada umumnya menyerang udang pada stadium *mysis* sampai awal pasca larva (Agung, 2007).

Mekanisme penyerangan bakteri *Vibrio harveyi* terhadap larva udang windu menurut Prajitno (2007) penyakit bakteri *Vibrio harveyi* yang menyerang pada larva udang windu melalui mulut kemudian menginfeksi saluran pencernaan dan mengakibatkan hepatopankreas rusak. Kondisi tersebut mengakibatkan pertumbuhan larva udang windu terhambat bahkan menyebabkan kematian. Insang yang terinfeksi juga disebabkan wabah penyakit dari luar yang masuk ke dalam tubuh udang windu bersama dengan air masuk ke lamella insang kemudian melalui kapiler darah dan akan merusak jaringan sekitarnya serta merusak organ hepatopankreas khususnya nukleus. Bilamana keadaan ini terjadi maka akan berdampak pada kematian udang windu. Serangan *Vibrio harveyi* juga terjadi pada organ kulit. Jaringan kulit merupakan organ yang paling luar dari tubuh udang windu yang berhubungan langsung dengan perairan. Peradangan yang terjadi akibat infeksi bakteri *Vibrio harveyi* menyebabkan jaringan otot mengalami kontraksi sehingga aktivitas larva udang menjadi meningkat dan

menyebabkan produksi lendir berlebihan. Akibat lebih lanjut adalah masuknya bakteri diantara carapase. Infeksi udang juga terjadi pada organ jantung yang mengalami kelainan. Infeksi juga bisa berasal dari induk udang. Induk dari alam ada kemungkinan mengandung bakteri *Vibrio harveyi*, maka besar pula kemungkinan telur dan nauplius yang dihasilkan akan terkontaminasi oleh bakteri tersebut. Terutama bila pencucian telur dan nauplius tersebut kurang bersih sehingga saat kondisi pemeliharaan memburuk, bakteri tersebut tumbuh dan berkembang menjadi patogen.

Menurut Boer dan Zafran (1992), larva udang windu yang terinfeksi oleh bakteri bercahaya umumnya memperlihatkan gejala yang sama, yakni hepatopankreas berubah warna menjadi coklat kehitaman dan mengalami penyusutan. Berdasarkan pengamatan preparat histopatologi pada hepatopankreas udang yang terinfeksi bakteri *Vibrio harveyi* terlihat bahwa hepatopankreas mengalami kehancuran dan penuh dengan bakteri gram negatif berbentuk batang. Menurut Huervana *et al.* (2006), *Vibrio harveyi* menyerang organ pencernaan pada udang, organ yang diinfeksi yaitu pada bagian hepatopankreas sehingga mengalami difusi peradangan di seluruh bagian hepatopankreas (Harris dan Owen, 1999). Robertson *et al.* (1998) mengatakan bahwa bakteri *Vibrio harveyi* bersifat patogen jika digunakan dalam perendaman selama 2 jam dengan dosis 10^5 sel/ml.

Sifat pathogenitas bakteri *Vibrio harveyi* menurut Prajitno (2007) adalah :

- Serangan terjadi secara cepat dan menimbulkan kematian total.
- Udang yang terserang biasanya hancur sehingga bangkainya tidak kelihatan.
- Bakteri ini dapat memusnahkan larva dalam waktu 1-2 hari sejak serangan awal.
- Bakteri ini mudah menular (melalui pakan, air, peralatan maupun aktivitas manusia).

- Bakteri ini dapat menyerang sepanjang tahun tetapi cenderung terjadi pada saat perubahan iklim atau suhu yang mendadak.

Sejumlah bakteri dapat secara serempak menghasilkan cahaya. Peristiwa ini disebut *bioluminescens* apabila telah mencapai suatu *quorum*. Peristiwa ini dapat diamati saat terjadi serangan penyakit "kunang-kunang" pada benur atau larva udang di sejumlah panti pemeliharaan benur (*shrimp hatchery*). Pada malam hari benur tampak seperti kunang-kunang yang berenang di dalam air dan keesokan harinya hampir semua benur ditemukan mati. Suatu spesies *Vibrio* (bisa *V. harveyi* atau *V. campbelli*) merupakan bakteri laut yang umum dijumpai pada air laut. Namun, bila jumlah bakteri ini menjadi banyak (lebih dari 100 sel/milimeter air laut atau air payau) atau benurnya dalam kondisi tidak sehat, maka jumlah bakteri ini dapat meningkat dengan cepat di dalam tubuh benur sehingga tercapai *quorum* dan secara bersamaan menyala yang mengakibatkan fenomena kerlap-kerlip pada benur di malam hari. Kumpulan *Vibrio* tersebut tidak hanya menyala tetapi juga mengeluarkan segala macam koleksi enzim ekstraselular yang akhirnya membunuh benurnya. Pada benur yang sehat secara normal dapat ditemukan *Vibrio harveyi* tetapi jumlahnya di bawah *quorum*, sehingga tidak terjadi pathogen pada benur udang windu. apabila jumlahnya mencapai *quorum* bisa mengubah perilakunya dari saprofit menjadi pathogen. Pada sejumlah bakteri gram negatif termasuk *Vibrio*, yang telah dipelajari ternyata kelompok bakteri ini menggunakan senyawa *acyl homoserine lactone* (AHL) tertentu untuk sinyal komunikasi atau bahasanya. AHL ini umumnya bersifat khusus untuk spesies bakteri tertentu. Sebagai contoh: *Vibrio harveyi* menggunakan *N-(3-hydroxy)-butanoyl-L-homoserine lactone* sebagai sinyalnya. Bila jumlah selnya telah mencapai kepadatan tertentu maka AHL itu akan membentuk kompleks dengan protein pengatur khusus yang akhirnya berfungsi untuk mengaktifkan

ekspresi sejumlah gen-gen penyandi enzim-enzim untuk menciptakan *bioluminescence*, enzim khitinase, dan protease ekstraseluler, serta faktor-faktor patogenesis lainnya (Suwanto, 2002).

Patogenitas bakteri dapat dipengaruhi oleh toksin serta enzim-enzim yang dapat dihasilkan. Sesuai hasil penelitian Goarant *et al.* (2000) bahwa ekstraseluler produk (ECPs), yakni phosphatase, esterase, lipase, phosphohydrolase, N-acetil- β -glucosamidase dari *V. Alginolyticus*, *V. Penaecida* dan *V. Nigripulchritudo* bersifat toksik terhadap udang (*Litopenaeus stylirosus*) pada suhu 20°C. Hasil penelitian Harris dan Owen (1999) menyatakan bahwa protein eksotoksin dari *Vibrio Harveyi* dapat menyebabkan kematian terhadap udang windu (*P. Monodon*) pada konsentrasi yang relatif rendah. Sementara itu, ekstraseluler produk (*cystein protease*) dapat menyebabkan koagulasi/hemostatis pada udang windu *P. Monodon* (Lee *et al.*, 1999). Menurut Zhong *et al.*, (2001), protease, phospholipase, atau hemolysin yang terkandung pada *Vibrio harveyi* sangat berperan sebagai patogenitas. Kandungan protease cysteine pada *Vibrio harveyi* dilaporkan dapat menjadi exotoxin pada udang windu.

III. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya, pada bulan Juni 2008 -Januari 2009.

3.2 Bahan dan Alat

3.2.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sumber isolat (air mangrove), kapas, kertas tisu, akuades steril, spirtus, plastik wrapper, plastik tahan panas, sabun, kertas label, kertas saring, alkohol 70%, larutan garam fisiologis (0,85% NaCl), media NA (*Nutrien Agar*), NaCl 3 %, media LA (*Luria Bertani Agar*), media NB (*Nutrient Broth*), media MR/VP (*Methyl Red Voges-Prokauer*), reagen Barrit A dan B, larutan pewarnaan gram, pewarna malikat hijau, pewarna safranin, larutan H₂O₂ 3%, TSB (*Trypton Soya Broth*), reagen kovac dan media sitrat simon.

3.2.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: botol aqua, beaker glass, tabung reaksi, erlenmeyer, cawan petri, jarum ose, bunsen, tusuk sate (untuk uji total), korek api, penggaris, kain lap, shaker, oven, jarum enten, objek glass, cover glass, pipet, mikropipet, autoklaf, inkubator, karet, kulkas, kompor, rak, botol semprot, hemocytometer, vortex dan spektrofotometer.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Pengambilan Sampel

Sumber isolat yang digunakan dalam penelitian ini adalah air kawasan mangrove Kelurahan Ketapang, Kecamatan Kademangan, Kota Probolinggo. Pengambilan sampel

air mangrove dilakukan pada bulan Juni tahun 2008. Sampel tersebut merupakan pencampuran dari lima titik yang diambil secara acak kemudian dihomogenkan menjadi satu sampel.

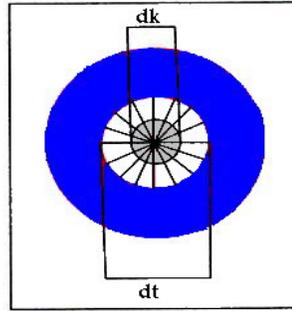
3.3.2 Isolasi, Karakterisasi Morfologi Koloni dan Purifikasi

Sampel air mangrove sebanyak 5 ml dimasukkan ke dalam 45 ml larutan pengencer (0,85% NaCl) sebagai pengenceran 10^{-1} . Suspensi kemudian diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam 9 ml larutan garfis (garam fisiologis) sebagai pengenceran 10^{-2} dan seterusnya sampai pada pengenceran 10^{-8} . Sebanyak 1 ml suspensi dari tiap-tiap seri pengenceran diinokulasikan ke dalam media *Nutrient Agar* (NA) untuk isolasi. Metode yang digunakan adalah metode cawan tuang (*pour plate*) secara duplo. Menurut Marwati (2007), teknik *pour plate* (lempeng tuang) adalah suatu teknik untuk menumbuhkan mikroorganisme di dalam media agar dengan cara mencampurkan media agar yang masih cair dengan stok kultur bakteri. Teknik ini biasa digunakan pada uji TPC (*Total Plate Count*). Kelebihan teknik ini adalah mikroorganisme yang tumbuh dapat tersebar merata pada media agar. Selanjutnya biakan diinkubasi pada suhu ruang selama 2-7 hari atau sampai koloni terbentuk. Koloni-koloni yang tumbuh selanjutnya dikarakterisasi morfologi koloninya, meliputi: bentuk, elevasi, tepi, struktur dalam dan warna koloni.

Koloni bakteri tersebut kemudian dimurnikan secara *continuous streak* pada media LA (*Luria Bertani Agar*) dan diinkubasi selama 1-2 hari pada suhu ruang. *Single* koloni yang tumbuh diinokulasikan pada media miring NA (*Nutrient Agar*) sebagai stok kultur murni.

3.3.3 Uji Daya Hambat terhadap Densitas Bakteri *Vibrio harveyi*

Uji daya hambat terhadap bakteri *Vibrio harveyi* dilakukan pada 48 isolat yang telah dimurnikan. Daya hambat dapat diketahui dengan terbentuknya zona hambat di sekitar koloni. Menurut Marwati (2007), pengujian tersebut dilakukan dengan menggunakan metode totol yaitu metode untuk mengambil bakteri dengan menggunakan tusuk sate dan setelah itu di totolkan pada media *Nutrient Agar* (NA) dan NaCl 3% yang telah di *pour plate* dengan bakteri *Vibrio harveyi*. Isolat-isolat bakteri tersebut diinokulasikan dengan menggunakan tusuk sate steril dan selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang atau sampai zona hambat terbentuk. Berdasarkan pengujian yang dilakukan pada 48 isolat menunjukkan 2 isolat mempunyai kemampuan menghambat bakteri *Vibrio harveyi*. Isolat yang mampu menghambat bakteri *Vibrio harveyi* yaitu isolat M₃₅ dan M₄₁. Dua isolat tersebut kemudian diuji daya hambatnya kembali dengan menginokulasikan 1 ose bakteri *Vibrio harveyi* pada media *Nutrient Broth* (NB) 12 ml. Kultur tersebut kemudian dishaker selama 24 jam dan dihitung kepadatannya dengan menggunakan haemocytometer. Setelah kepadatan bakteri *Vibrio harveyi* mencapai 2×10^8 , dilakukan seri pengenceran dari 2×10^8 sampai 2×10^3 , sehingga didapat 6 seri pengenceran. Sebanyak 1 ml seri pengenceran tersebut diinokulasikan ke dalam media NA (*Nutrient Agar*) dan NaCl 2 % untuk dilakukan isolasi. Metode yang dilakukan adalah metode cawan tuang (*pour plate*) secara duplo. Selanjutnya isolat M₃₅ dan M₄₁ diinokulasikan dengan menggunakan metode totol dan diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam atau sampai zona hambat terbentuk. Ukur luas zona hambat isolat M₃₅ dan M₄₁ dengan menghitung luas besar dikurangi luas kecil dibagi dengan luas kecil. Cara perhitungan zona hambat dapat di lihat pada Gambar 1. (Marwati, 2007).



Gambar 1. Perhitungan Zona Hambat

Keterangan gambar:

dt : diameter total (jumlah keseluruhan diameter total dibagi jumlah diameter besar yang dihitung)

dk : diameter koloni (jumlah keseluruhan diameter kecil dibagi jumlah diameter kecil yang dihitung)

$$\text{Index} = Lz / Lk$$

Perhitungan:

$$\text{Luas total (Lt)} = \pi r_t^2$$

$$\text{Luas koloni (Lk)} = \pi r_k^2$$

$$\text{Luas zona (Lz)} = L_t - L_k$$

3.3.4 Karakteristik Fisiologi dan Biokimia Isolat M₃₅ dan M₄₁ Bakteri *Indigenius Mangrove*

Isolat M₃₅ dan M₄₁ merupakan isolat yang mempunyai kemampuan dalam menghambat bakteri *Vibrio harveyi* yang ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambat di sekitar isolat. Kedua isolat tersebut kemudian dikarakterisasi meliputi: pewarnaan

gram, uji MR/VP (Metil Red Voges-Proskauer), uji produksi katalase, uji sitrat simmons, uji motilitas dan uji endospora.

Pewarnaan gram dilakukan dengan cara membuat preparat apusan bakteri. Sebanyak 1 ose biakan bakteri berumur 24 jam dengan jarum ose dan diratakan diatas gelas objek yang telah ditetesi dengan akuades steril. Fiksasi preparat diatas api bunsen hingga kering. Preparat yang telah difiksasi kemudian ditetesi dengan cat gram A (kristal violet) (komposisi pada Lampiran 1) selama 1-3 menit. Sisa cat gram A dibuang, kemudian preparat dicuci dengan air mengalir. Preparat kemudian digenangi dengan cat gram B (iodine) (komposisi pada Lampiran 1) selama 0,5-1 menit, selanjutnya sisa gram B dibuang dan preparat dicuci dengan air mengalir. Preparat ditetesi dengan cat gram C (komposisi pada Lampiran 1) sampai warna cat tepat terlunturkan (\pm 30 detik). Sisa cat gram C dibuang, kemudian digenangi dengan cat gram D (komposisi pada Lampiran 1) selama 1-2 menit. Sisa cat gram D dibuang kemudian preparat dikering anginkan. Preparat diamati menggunakan mikroskop untuk mengetahui jenis cat gram dan karakteristik morfologi sel bakteri. Menurut Marwati (2007), akibat pemberian cat gram akan terjadi dua kemungkinan yaitu : bakteri gram positif akan tetap berwarna ungu karena telah jenuh mengikat cat gram A sehingga tidak mampu lagi mengikat cat gram D. Bakteri gram negatif akan berwarna merah karena cat sebelumnya telah dilunturkan oleh cat gram C maka akan mampu mengikat cat gram D.

Langkah pertama yang dilakukan untuk pengujian MR/VP ialah menginokulasikan 1 ose isolat bakteri yang berumur 24 jam ke dalam media *Metil Red Voges-Proskauer* (MR/VP) (komposisi pada Lampiran 1). Selanjutnya inkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Setengah kultur biakan dituang ke dalam tabung reaksi yang steril dan diberi

tanda. Tabung pertama untuk uji MR dan tabung kedua untuk uji VP. Tabung pertama ditetesi dengan 3-4 tetes indikator *Methyl Red*. Uji dikatakan positif bila kultur berubah warna menjadi merah dan uji dikatakan negatif bila kultur berubah warna menjadi kuning. Tabung kedua ditetesi dengan 10 tetes reagen barrit A dan reagen barrit B (komposisi pada Lampiran 1) kemudian larutan dikocok selama 20-30 menit. Uji dikatakan positif bila kultur berubah warna menjadi merah muda dan negatif bila kultur tidak terjadi perubahan warna.

Uji katalase dilakukan dengan membersihkan gelas objek dengan etanol 70% kemudian dikeringkan. Dua tetes *hidrogen peroksida* (H_2O_2) (komposisi pada Lampiran 1) ditetaskan pada objek gelas. Kemudian tambahkan satu ose biakan bakteri berumur 24 jam dari media NA diatas larutan H_2O_2 dan dicampur dengan ose. Reaksi dikatakan positif apabila terbentuk gelembung oksigen (seperti busa). Hal tersebut menunjukkan isolat tersebut menghasilkan enzim katalase yang mengubah H_2O_2 menjadi air dan oksigen.

Uji sitrat simmons dilakukan dengan menginokulasikan isolat ke dalam media miring agar sitrat simmons (komposisi pada Lampiran 1) dengan jarum ose. Biakan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Amati perubahan warnanya. Uji ini dikatakan positif bila media sitrat simmons yang semula berwarna ungu berubah warna menjadi biru.

Uji motilitas dilakukan dengan cara menginokulasikan biakan secara tegak lurus ke dalam media *Motility Indole Ornithine* (MIO) (komposisi pada Lampiran 1) menggunakan jarum enten. Biakan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Uji ini dikatakan positif bila warna media menjadi kuning dan pertumbuhan bakteri

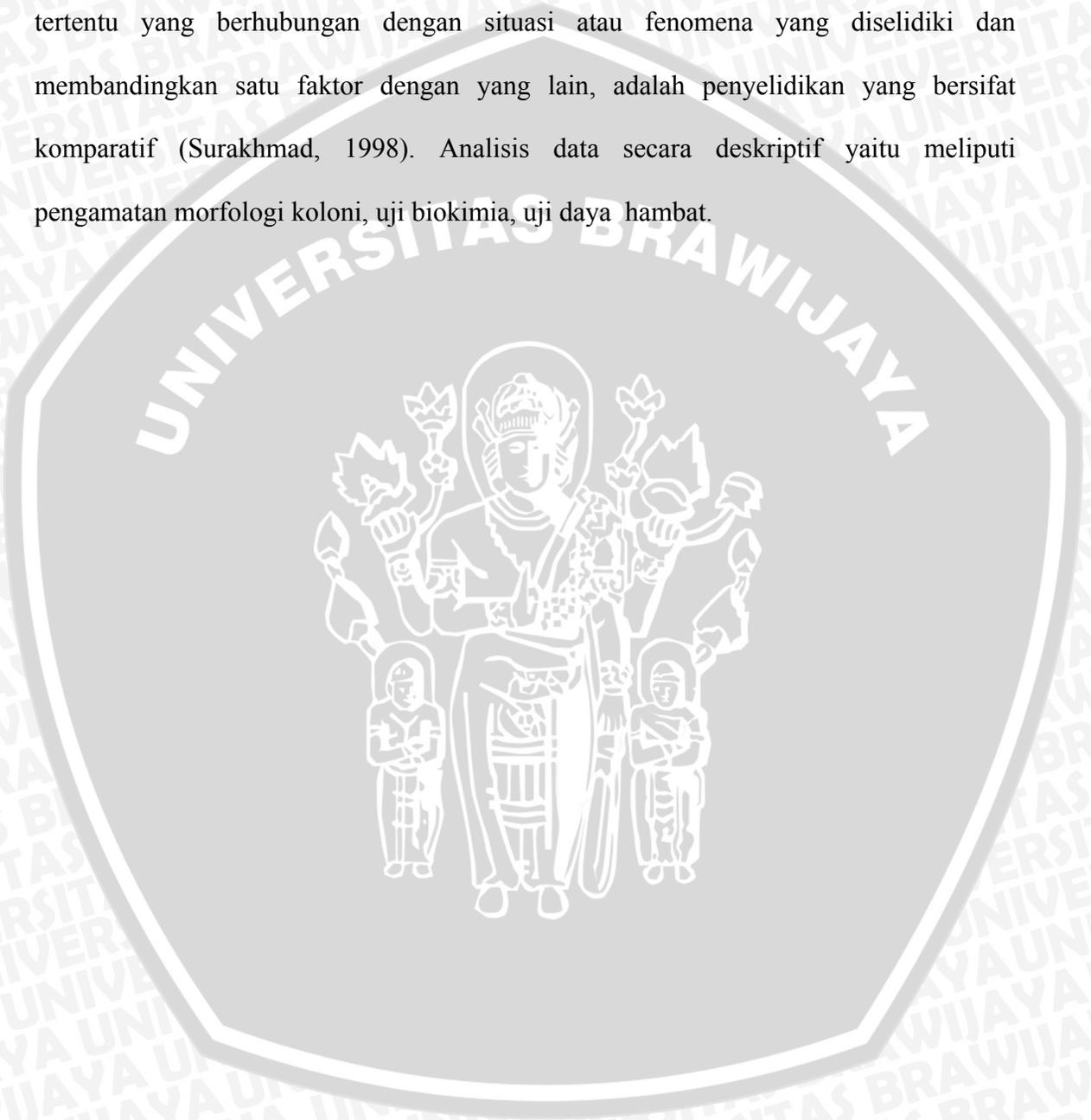
tersebar di sepanjang garis tusukan. Perubahan warna ini menunjukkan adanya produksi asam. Sebaliknya, uji ini dikatakan negatif bila pertumbuhan bakteri hanya pada garis tusukan dan tidak terjadi perubahan warna pada media.

Uji endospora dilakukan dengan membuat preparat apusan bakteri. Biakan bakteri berumur 24 jam diambil secukupnya dengan jarum ose dan diratakan diatas gelas objek yang telah ditetesi dengan akuades steril. Fiksasi preparat diatas api bunsen hingga kering. Selanjutnya genangi preparat tersebut dengan pewarna malakit hijau (komposisi pada Lampiran 1) dan panaskan ke dalam ram kawat diatas pemanas air yang telah mendidih sampai uap air timbul. Perlakuan ini dimaksudkan agar pewarna ini dapat masuk secara optimal ke dalam endospora. Selama pemanasan ini berlangsung teteskan larutan pewarna malakit hijau agar preparat ini tidak kering selama 10 menit. Setelah itu, cuci kelebihan pewarna dengan air mengalir dan keringanginkan. Tiriskan kaca objek dan serap sisa air dari preparat dengan kertas hisap. Preparat yang telah terwarnai tersebut kemudian amati struktur spora dalam selnya menggunakan mikroskop perbesaran 1000x dengan minyak emersi. Uji ini dikatakan positif bila endospora berwarna hijau.

3.4. Metode Penelitian

Metode yang digunakan adalah deskriptif. Menurut Nazir (2005), secara harfiah, penelitian deskriptif adalah penelitian yang bermaksud untuk membuat pencandraan mengenai situasi-situasi atau kejadian-kejadian. Dalam arti ini penelitian deskriptif adalah akumulasi data dasar dalam cara deskriptif semata-mata tidak perlu mencari atau menerangkan saling hubungan, membuat ramalan, atau mendapatkan makna dan implikasi.

Metode deskriptif yang digunakan disini adalah metode deskriptif studi komparatif. Penyelidikan deskriptif yang berusaha mencari pemecahan melalui analisa tentang perhubungan-perhubungan sebab akibat, yakni yang meneliti faktor-faktor tertentu yang berhubungan dengan situasi atau fenomena yang diselidiki dan membandingkan satu faktor dengan yang lain, adalah penyelidikan yang bersifat komparatif (Surakhmad, 1998). Analisis data secara deskriptif yaitu meliputi pengamatan morfologi koloni, uji biokimia, uji daya hambat.



IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Isolasi dan Karakteristik Koloni Bakteri Indigenous Mangrove

Hasil isolasi bakteri dari kawasan mangrove Kelurahan Ketapang Kecamatan Kademangan Kabupaten Probolinggo menghasilkan 48 isolat. Karakterisasi morfologi isolat-isolat tersebut dilakukan untuk mengetahui perbedaan koloni baik dari segi bentuk, elevasi, tepi, struktur dalam dan warna koloni. Karakteristik morfologi bakteri dari kawasan mangrove dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Karakteristik Morfologi Bakteri dari Kawasan Mangrove

No	Kode Isolat	Karakteristik Morfologi Koloni				
		Bentuk	Elevasi	Tepi	Struktur Dalam	Warna
1	M ₁	Circular	Low convex	Entire	Finely granular	White
2	M ₂	Circular	Low convex	Entire	Transparant	White
3	M ₃	Irregulair	Low convex	Undulate	Smooth	White
4	M ₄	Irregulair	Low convex	Crenate	Smooth	White
5	M ₅	Rhizoid	Effuse	Undulate	Smooth	White
6	M ₆	Circular	Low convex	Undulate	Finely granular	Light-Yellow
7	M ₇	Circular	Low convex	Entire	Smooth	White
8	M ₈	Irregulair	Low convex	Undulate	Finely granular	Light-Yellow
9	M ₉	Circular	Convex	Entire	Opaque	Light-Yellow
10	M ₁₀	Circular	Convex	Entire	Translucent	White
11	M ₁₁	Circular	Convex	Entire	Opaque	Light-Yellow
12	M ₁₂	Circular	Convex	Entire	Filamentous	Light-yellow
13	M ₁₃	Circular	Low convex	Entire	Coarsely granular	White
14	M ₁₄	Circular	Low convex	Entire	Transparant	Light-yellow
15	M ₁₅	Circular	Convex	Entire	Opaque	White
16	M ₁₆	Circular	Low convex	Entire	Translucent	White
17	M ₁₇	Rhizoid	Low convex	Entire	Coarsely granular	Light-yellow
18	M ₁₈	Rhizoid	Low convex	Fimbriate	Coarsely granular	White
19	M ₁₉	Circular	Low convex	Entire	Transparant	White
20	M ₂₀	Circular	Convex	Entire	Opaque	Light-yellow
21	M ₂₁	Curled	Low convex	Undulate	Transparant	Light-yellow
22	M ₂₂	Circular	Convex	Undulate	Opaque	White
23	M ₂₃	Circular	Low convex	Entire	Transparant	Red
24	M ₂₄	Circular	Low convex	Entire	Smooth	Orange

Dilanjutkan...

Lanjutan (Tabel 2)

25	M ₂₅	Myceloid	Convex	Entire	Opaque	White
26	M ₂₆	Circular	Convex	Fimbriate	Opaque	White
27	M ₂₇	Circular	Low convex	Undulate	Translucent	Yellow
28	M ₂₈	Circular	Convex	Entire	Opaque	Orange
29	M ₂₉	Circular	Convex	Undulate	Opaque	White
30	M ₃₀	Rhizoid	Effuse	Undulate	Opaque	White
31	M ₃₁	Circular	Convex	Undulate	Smoath	White
32	M ₃₂	Circular	Low convex	Entire	Opaque	White
33	M ₃₃	Irregulair	Low convex	Undulate	Transparant	White
34	M ₃₄	Circular	Convex	Undulate	Opaque	White
35	M ₃₅	Circular	Low convex	Entire	Opaque	White
36	M ₃₆	Irregulair	Low convex	Undulate	Transparant	White
37	M ₃₇	Circular	Convex	Entire	Opaque	White
38	M ₃₈	Circular	Convex	Entire	Opaque	White
39	M ₃₉	Circular	Convex	Entire	Opaque	White
40	M ₄₀	Irregulair	Low convex	Undulate	Transparant	White
41	M ₄₁	Circular	Low convex	Entire	Opaque	White
42	M ₄₂	Circular	Convex	Entire	Opaque	White
43	M ₄₃	Circular	Convex	Entire	Opaque	White
44	M ₄₄	Circular	Convex	Entire	Opaque	White
45	M ₄₅	Rhizoid	Effuse	Undulate	Opaque	White
46	M ₄₆	circular	Convex	Entire	Translucent	White
47	M ₄₇	Irregulair	Low convex	Undulate	Transparant	White
48	M ₄₈	Circular	Convex	Entire	Opaque	White

Penggolongan karakterisasi morfologi berdasarkan bentuk, elevasi, tepi, struktur dalam dan warna koloni sangat diperlukan dalam menentukan jenis suatu bakteri (untuk keterangan istilah dapat dilihat pada Daftar Istilah) Berdasarkan data pada Tabel 2 dapat diperoleh presentase karakteristik morfologi isolat-isolat bakteri *indigenous* mangrove yang dapat dilihat pada Tabel 3.

Berdasarkan Tabel 3 dapat diketahui presentase tertinggi dari karakteristik morfologi koloni bakteri *indigenous* mangrove adalah: bentuk circular (70,83%), elevasi low convex (50%), tepi entire (60,42%), struktur dalam opaque (45,83%) warna putih (72,92%). Bakteri yang mendominasi kawasan mangrove adalah bakteri yang

mempunyai bentuk circular, elevasi low convex, tepi entire, struktur dalam opaque, berwarna putih. Menurut Sumarsih (2003); Losekann *et al.* (2007); Varnaite *et al.* (2008), bentuk koloni bakteri yang berbeda-beda tersebut merupakan ciri khas bagi suatu spesies tertentu. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa 48 isolat bakteri *indigenous* mangrove mempunyai karakteristik morfologi yang berbeda.

Tabel 3. Persentase Karakteristik Morfologi Koloni Isolat-Isolat Bakteri *Indigenous* Mangrove

No	Karakteristik Morfologi Koloni	Persentase
1	Bentuk	
	➤ Circular	70,83%
	➤ Irregulair	14,58%
	➤ Rhizoid	10,42%
	➤ Myceloid	2,08%
➤ Curled	2,08%	
2	Elevasi	
	➤ Low convex	50%
	➤ Convex	43,75%
➤ Effuse	6,25%	
3	Tepi	
	➤ Entire	60,42%
	➤ Undulate	33,33%
	➤ Crenate	2,08%
➤ Frimbiate	4,17%	
4	Struktur Dalam	
	➤ Smooth	12,5%
	➤ Finely granular	6,25%
	➤ Coarsely granular	6,25%
	➤ Opaque	45,83%
	➤ Transparant	18,75%
	➤ Translucent	8,33%
➤ Fillamentous	2,08%	

4.2 Uji Hambat Isolat-Isolat Bakteri *Indigenous* Mangrove terhadap Densitas Bakteri *Vibrio harveyi*

Isolat-isolat yang didapatkan kemudian di uji daya hambatnya terhadap *Vibrio harveyi*. Gunarto *et al.* (2006); Muliani *et al.* (2006) menyatakan bahwa isolat yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio harveyi* ditunjukkan dengan adanya zona hambat di sekitar koloni. Kemampuan daya hambat isolat-isolat bakteri *indigenous* mangrove terhadap *vibrio harveyi* dapat di lihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Kemampuan Daya Hambat Isolat-isolat Bakteri *Indigeneous* Mangrove terhadap *Vibrio harveyi*

No	Kode Isolat	Uji Daya Hambat
1	M ₁	-
2	M ₂	-
3	M ₃	-
4	M ₄	-
5	M ₅	-
6	M ₆	-
7	M ₇	-
8	M ₈	-
9	M ₉	-
10	M ₁₀	-
11	M ₁₁	-
12	M ₁₂	-
13	M ₁₃	-
14	M ₁₄	-
15	M ₁₅	-
16	M ₁₆	-
17	M ₁₇	-
18	M ₁₈	-
19	M ₁₉	-
20	M ₂₀	-
21	M ₂₁	-
22	M ₂₂	-
23	M ₂₃	-
24	M ₂₄	-
25	M ₂₅	-
26	M ₂₆	-
27	M ₂₇	-

Dilanjutkan...

Lanjutan (Tabel 4)

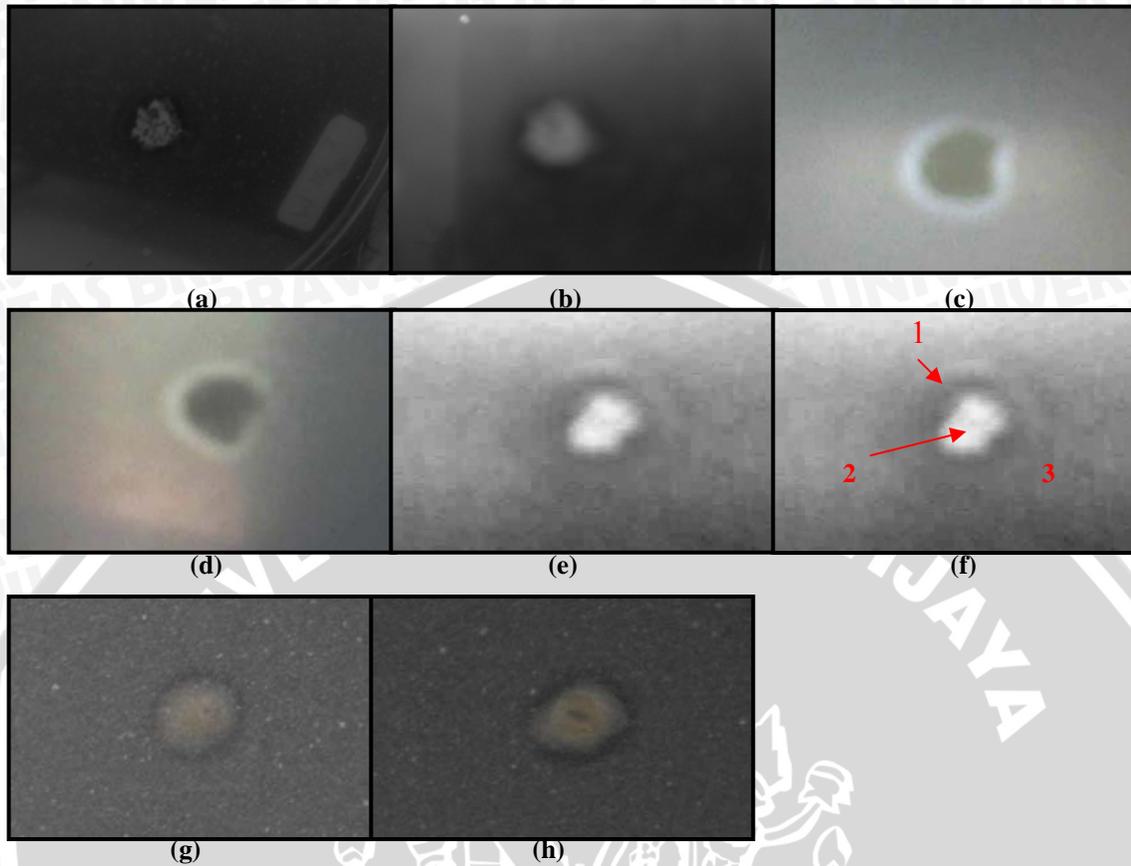
28	M ₂₈	-
29	M ₂₉	-
30	M ₃₀	-
31	M ₃₁	-
32	M ₃₂	-
33	M ₃₃	-
34	M ₃₄	-
35	M ₃₅	+
36	M ₃₆	-
37	M ₃₇	-
38	M ₃₈	-
39	M ₃₉	-
40	M ₄₀	-
41	M ₄₁	+
42	M ₄₂	-
43	M ₄₃	-
44	M ₄₄	-
45	M ₄₅	-
46	M ₄₆	-
47	M ₄₇	-
48	M ₄₈	-

Keterangan :

(-) = tidak membentuk zona hambat

(+) = membentuk zona hambat

Berdasarkan Tabel 4 dapat diketahui isolat yang mampu menghambat *Vibrio harveyi* adalah isolat M₃₅ dan M₄₁. Hal tersebut di tandai dengan adanya pembentukan zona hambat disekitar koloni isolat M₃₅ dan M₄₁. Kedua isolat tersebut mampu menghasilkan suatu senyawa antibiotik yang terdifusi ke media sehingga menyebabkan pertumbuhan *Vibrio harveyi* yang ada di sekitar koloni isolat M₃₅ dan M₄₁ terhambat. Hal tersebut juga bisa disebabkan karena isolat M₃₅ dan M₄₁ bersaing dengan *Vibrio harveyi* dalam merebutkan nutrisi sebagai sumber makanan untuk hidup.



Gambar 2. Gambar Zona Hambat Isolat M₃₅ dan M₄₁

(a) Zona hambat isolat M₄₁ kepadatan 2×10^6 ; (b) Zona hambat isolat M₄₁ kepadatan 2×10^6 ; (c) Zona hambat isolat M₄₁ kepadatan 2×10^7 ; (d) Zona hambat isolat M₄₁ kepadatan 2×10^7 ; (e) Zona hambat isolat M₄₁ kepadatan 2×10^8 ; (f) Zona hambat isolat M₄₁ kepadatan 2×10^8 ; (g) Zona hambat isolat M₃₅ kepadatan 2×10^8 ; (h) Zona hambat isolat M₃₅ kepadatan 2×10^8

Keterangan :

1. Zona Hambat
2. Isolat M₃₅ dan M₄₁
3. Media NA+*Vibrio harveyi*

Setelah diketahui bahwa isolat M₃₅ dan M₄₁ mampu menghambat *Vibrio harveyi* maka dilanjutkan dengan pengujian isolat M₃₅ dan M₄₁ dalam menghambat bakteri *Vibrio harveyi* dengan densitas yang berbeda-beda. Hasil pengujian dari beberapa kepadatan *Vibrio harveyi* didapatkan bahwa isolat M₄₁ mampu menghambat bakteri *Vibrio harveyi* pada densitas 2×10^6 - 2×10^8 (Gambar 2). Indeks zona hambat yang

dihasilkan isolat M₄₁ sebesar 1,79 (pada kepadatan *Vibrio harveyi* 2x10⁶), 3,16 (pada kepadatan *Vibrio harveyi* 2x10⁷) dan 5,83 (pada kepadatan *Vibrio harveyi* 2x10⁸).

Pembentukan zona Hambat disekitar isolat M₃₅ dan M₄₁ merupakan mekanisme penghambatan (antagonisme) isolat M₃₅ dan M₄₁ terhadap *Vibrio harveyi* secara antibiosis. Kedua isolat tersebut mampu menghasilkan antibiotik yang terdifusi ke media sehingga menyebabkan pertumbuhan *Vibrio harveyi* yang ada di sekitar koloni isolat M₃₅ dan M₄₁ terhambat. Menurut Cook dan Baker (1998) indikator antagonisme suatu bakteri tertentu dapat diketahui (dideteksi) berdasarkan kemampuan antibiosisnya terhadap bakteri patogen yang ditandai dengan terbentuknya zona hambat. Indeks zona hambat isolat M₃₅ dan M₄₁ bakteri *indigenus* mangrove dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Indeks Zona Hambat Isolat M₃₅ dan M₄₁ Bakteri *Indigenous* Mangrove

No	Σ Kepadatan Bakteri <i>Vibrio harveyi</i>	Indeks zona hambat	
		Isolat M ₃₅	Isolat M ₄₁
1	2 x 10 ³	-	-
2	2 x 10 ⁴	-	-
3	2 x 10 ⁵	-	-
4	2 x 10 ⁶	-	1,79
5	2 x 10 ⁷	-	3,16
6	2 x 10 ⁸	2,33	5,83

Keterangan :

(-) = tidak ada zona hambat

4.3. Karakteristik Fisiologis dan Biokimia

Karakteristik fisiologis dan biokimia dilakukan untuk mendukung identifikasi isolat-isolat. Karakteristik tersebut meliputi: pewarnaan gram dan pengamatan bentuk sel. Sedangkan uji biokimia yang dilakukan adalah uji *Methyl red*, uji *Voges Proskauer*,

uji katalase, uji sitrat simmon, uji motilitas, dan uji endospora. Karakter fisiologi dan biokimia isolat M₃₅ dan M₄₁ tersaji pada Tabel 6.

Tabel 6. Karakter Fisiologi dan Biokimia isolat M₃₅ dan M₄₁

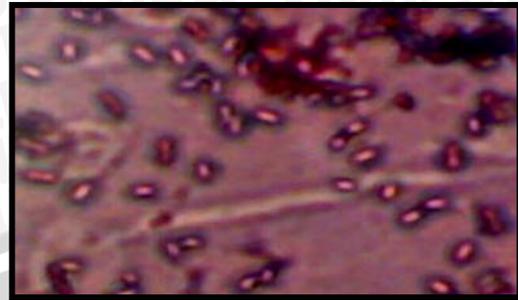
No	Karakteristik	Hasil Uji	
		M ₃₅	M ₄₁
1	Pewarnaan Gram	-	-
2	Bentuk Sel	Batang	Batang
3	Reaksi <i>Methyl Red</i>	-	-
4	Reaksi <i>Voges Proskauer</i>	-	-
5	Katalase	+	+
6	Sitrat Simmon	-	-
7	Motilitas	+	+
8	Endospora	+	+

Keterangan:

(+) = Reaksi Positif

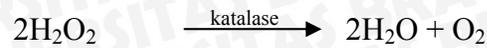
(-) = Reaksi Negatif

Isolat M₃₅ dan M₄₁ merupakan bakteri gram negatif dan berbentuk batang (Gambar 3). Menurut wikipedia (2008), bakteri gram negatif adalah bakteri yang tidak mempertahankan zat warna metil ungu pada metode pewarnaan gram. Bakteri gram positif akan mempertahankan warna ungu gelap setelah dicuci dengan alkohol, sementara bakteri gram negatif tidak. Pada uji pewarnaan gram, suatu pewarna penimbal (*counterstain*) ditambahkan setelah metil ungu, yang membuat semua bakteri gram negatif menjadi berwarna merah atau merah muda. Pengujian ini berguna untuk mengklasifikasikan kedua tipe bakteri ini berdasarkan perbedaan struktur dinding selnya.

(Isolat M₃₅)(Isolat M₄₁)**Gambar 3. Hasil Pewarnaan Gram Isolat M₃₅ dan M₄₁**

Isolat M₃₅ dan M₄₁ menunjukkan hasil negatif pada uji MR (*Methyl Red*). Hasil ini mengindikasikan bahwa isolat yang diuji tidak menghasilkan asam, melainkan 2,3-butanadiol dan etanol. Bakteri yang melakukan hal semacam itu meliputi semua species *Enterobacter*, dan *Serratia*, dan beberapa species *Erwinia*, *Bacillus*, dan *Aeromonas* (Benson, 2002). Uji VP (*Voges-Proskauer*) juga menunjukkan hasil negatif karena tidak mengubah warna media menjadi merah. Pengujian dilakukan untuk mengetahui mikroorganisme yang melaksanakan fermentasi 2,3-butanadiol. Sesungguhnya tidak ada uji yang dapat secara langsung mendeteksi adanya 2,3 butanadiol. Namun, reagen barrit yang terdiri alpha-naphtol dan KOH dapat dengan mudah mendeteksi adanya asetoin (*asetil-metil karbinol*), yaitu prekursor 2,3 butanadiol (Benson, 2002).

Hasil uji katalase menunjukkan hasil yang positif, dapat dilihat dengan adanya gelembung udara seperti busa pada sekitar koloni setelah ditetesi H₂O₂. Hasil uji positif menunjukkan adanya dugaan bakteri memiliki karakter aerob atau anaerob fakultatif. Kebanyakan bakteri aerob atau anaerob fakultatif yang menggunakan oksigen menghasilkan *hidrogen peroksida* yang sesungguhnya bersifat racun bagi sistem-sistem enzimnya sendiri. Namun mereka dapat tetap hidup dengan adanya antimetabolit tersebut karena dihasilkannya enzim katalase yang dapat mengubah *hidrogen peroksida* menjadi air dan oksigen (Benson, 2002):



Matinya bakteri-bakteri anaerobik obligat bila ada oksigen disebabkan karena tidak adanya pembentukan enzim katalase sehingga H_2O_2 meracuni bakteri itu sendiri (Benson, 2002).

Hasil uji sitrat simmon menunjukkan reaksi negatif, karena warna medium sitrat simmon tetap berwarna hijau dan koloni tidak dapat tumbuh. Menurut Brooks (2005) medium agar sitrat simmon adalah medium sintetik yang mengandung sitrat sebagai sumber karbon satu-satunya, sedangkan sebagai sumber nitrogennya digunakan garam amonium dan bukan asam amino. Agar sitrat simmon juga mengandung indikator biru bromtimol yang dapat berubah warna dari hijau menjadi biru bila keadaan menjadi alkalin. Jadi bila organisme dapat tumbuh dengan menggunakan sitrat sebagai sumber karbon satu-satunya maka akan terlihat tumbuh pada permukaan agar miring yang digoreskan di atasnya di samping terjadi perubahan warna medium menjadi biru.

Isolat M₃₅ dan M₄₁ merupakan bakteri yang bersifat motil, terlihat pertumbuhan bakteri yang tersebar sepanjang garis tusukan jarum enten. Uji motilitas bertujuan untuk mengetahui suatu bakteri memiliki flagella atau tidak.

Uji Endospora menunjukkan hasil yang positif, terlihat pada pengamatan mikroskop terdapat spora yang berwarna hijau disekitar koloni. Menurut Campbell *et al.* (2008) endospora adalah sel resisten berlapis tebal yang dihasilkan di dalam sel bakteri yang terpapar ke lingkungan yang ganas.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

- Hasil isolasi bakteri yang diambil dari sampel air pada kawasan mangrove Kelurahan Ketapang, Kecamatan Kademangan, Kota Probolinggo di dapatkan sebanyak empat puluh delapan isolat.
- Dari ke empat puluh delapan isolat tersebut yang mempunyai daya hambat terhadap bakteri *Vibrio harveyi* yaitu isolat M₃₅ dan M₄₁.
- Isolat M₃₅ dan M₄₁ mempunyai bentuk circular, elevasi low convex, tepi entire, struktur dalam opaque dan berwarna putih.
- Isolat M₄₁ dapat menghambat bakteri *Vibrio harveyi* pada kepadatan 2×10^6 sampai 2×10^8 , masing-masing mempunyai index zona hambat berturut-turut yaitu 1,79 ; 3,16 dan 5,83.
- Isolat M₃₅ hanya bisa menghambat bakteri *Vibrio harveyi* pada kepadatan 2×10^8 dengan index zona hambat sebesar 2,33.
- Isolat M₃₅ dan M₄₁ merupakan kelompok gram negatif, berbentuk batang, *Methyl Red* negatif, *Voges Proskauer* negatif, katalase positif, sitrat simmon negatif, Motilitas positif, Endospora Positif.

5.2 Saran

- Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui identifikasi isolat M₃₅ dan M₄₁ dan perlunya adanya pengaplikasian secara langsung di lapang.



DAFTAR PUSTAKA

- Agung,. 2007. **Penelurusan Efektifitas Beberapa Bahan Alam sebagai Kandidat Antibakteri dalam Mengatasi Penyakit Vibriosis pada Udang Windu.** Kajian kepustakaan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Padjadjaran.Jatinangor. 9-10 hal.
- Ahmed *et al.*2003. **Plasmid Coded Halotolerance in Mangrove Soil Bacteria.** Pakistan Journal of Applied Sciences, 3 (8-9) : 548-555
- Andayani, Sri. 2005. **Pemanfaatan Bahan Aktif Ubur – Ubur (*Bogenvillia sp.*) sebagai Bakterisida terhadap Bakteri *Vibrio harveyi.*** Jurnal Penelitian Perikanan, 8(2):100-105
- Benson, H. 2002. **Microbiological Applications Manual in General Microbiology Eight Edition.** MC Graw Hill. Boston. 478 pp
- Boer, D. R. dan Zafran, 1992. **Karakteristik Beberapa Isolat Bakteri Bercahaya yang Diisolasi dari Larva Udang Windu *Penaeus monodon.*** Jurnal Penelitian Budidaya Pantai. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Balai Penelitian Perikanan Budidaya Pantai, 8 (3) : 93-98
- Brock, J. A and K. L. Main. 1994. **A Guide to The Common Problems and Diseases of Cultured *Penaeus Vannamei.*** The World Aquaculture Society. The Oceanic Institute, 143: 1-257.
- Brook, G, S. Janet, A. Stephen. 2005. **Mikrobiologi Kedokteran.** Salemba Medika. Jakarta. 528 hal
- Campbell, N, J. Reece, L. Mitchell. 2008. **Biologi.** Edisi Kelima Jilid 1. Erlangga. Jakarta. 438 hal
- Convention on Biological Diversity. 1998. **Biodiversity dan Manfaatnya.** <http://www.biotek.lipi.go.id/biotrends/biotrends%20edisi%20dua.pdf>. Diakses pada tanggal 19 Desember 2008
- Cook,R.J and Baker,K.F. 1998. **The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens.** American Pyhtopath.coc.St.Paul.Minnessota. 538 p. [http://rudycr.250x.com/semi 012/kel 012.htm](http://rudycr.250x.com/semi%20012/kel%20012.htm). diakses tanggal 19 Desember 2008
- Dahuri, R. 2003. **Keanekaragaman Hayati Laut Aset Pembangunan Berkelanjutan Indonesia.** PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. 412 hal
- Departemen Kelautan dan Perikanan. 2005. **Pedoman Teknis Penanggulangan Penyakit Ikan Budidaya Laut.** <http://www.Dkp.go.id>. Diakses pada tanggal 24 November 2008
- Dwidjoseputro. 1998. **Dasar-Dasar Mikrobiologi.** Djambatan. Jakarta. 214 hal

- Feliatra. 2001. **Identifikasi Bakteri Patogen (*Vibrio Sp*) di Perairan Nongsa Batam Propinsi Riau**. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Riau. Jurnal Natur Indonesia, 1 (1): 28 – 33
- Ferinaldy. 2008. **Produksi Perikanan Budidaya Menurut Komoditas Utama (2005-2009)**. <http://tentangan.wordpress.com/>. Diakses tanggal 07 januari 2009 Jam 11.00 WIB
- Gunarto. 2004. **Konservasi Mangrove sebagai Pendukung Sumber Hayati Perikanan Pantai**. Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau, Jalan Makmur Daeng Sitakka No. 129, Maros 90512, Sulawesi Selatan, 23(1): 16
- _____. 2006. **Budidaya Udang Windu (*Penaeus monodon*)** Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau. Sulawesi Selatan. Jurnal Litbang Pertanian, 37 (4): 60-62
- Gram, L., Melchiorson, J Lovold, T., Nielsen, J., and Spanggaard B, 1999. **Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a Possible Probiotic Treatment of Fish**. Applied and Environmental Microbiology, (65): 969 – 973
- Hariyanti *et al.* 2001. **Enhance Production of Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon* Postlarvae by Probiotik Bacterium *Alteromonas sp.*** Ind.fish.Res.J., (6) : 26-32
- Harris, L., Leigh O. and Sandra S. 1998. **A Selective and Differential Medium for *Vibrio harveyi***. Applied and Environmental Microbiology, 62(9):3548-3550
- Hjeltnes, B. and R. J. Roberts, 2001. **Vibriosis. In : Inglis, V, R. J. Robert, N. R. Bromage. Bacterial Disease of Fish**. Blackwell Science Ltd. USA. p 109-121
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley and S.T. Williams. 1979. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. Ninth Edition. Williams & Wilkins. Baltimore. USA
- Huervana *et al.* 2006. **Inhibition of Luminous *Vibrio Harveyi* by Green Water Obtained from Tank Culture of Tilapia (*Oreochromis Mossambicus*)**. Acta Ichthyologica Et Piscatoria journal, 36 (1): 17.23
- Irianto, Agus. 2003. **Probiotik Akuakultur**. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 40 hal
- Jutono. 1976. **Pedoman Praktikum Mikrobiologi Umum untuk Perguruan Tinggi**. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 231 hal
- Kordi, K.M.G. H. 2004. **Penanggulangan Hama dan Penyakit Ikan**. PT Rineka Cipta dan PT Bina Adiaksara. Jakarta. 194 hal

- Kuo-Kau Lee, Yi-Ling Chen and Ping-Chung Liu. 1999. **Hemostasis of Tiger Prawn *Penaeus monodon* Affected by *Vibrio harveyi*, Extracellular Products and a Toxic Cysteine Protease.** Blood Cells, Molecules, and Diseases, (15): 180–192
- Leafio, E.M. 2001. ***Straminipilous* organisms from Fallen Mangrove leaves from Panay Island.** Philippines. Fungal Diversity, (6): 75-81
- Lösekan, T., K. Knittel., T. Nadalig., B. Fuchs., H. Niemann., A. Boetius and Rudolf Amann. 2007. **Diversity and Abundance of Aerobic and Anaerobic Methane Oxidizers at the Haakon Mosby Mud Volcano, Barents Sea.** Appl Environ Microbiol, 73(10): 3348-3362
- Mahasneh, M.adel. 2001. **Bacterial Decomposition of *Avicennia marina* Leaf Litter from Al-khor (Qatar-Arabian Gulf).** OnLine Journal of Biological Sciences 1, (8): 717-719
- Marwati, Umi. 2007. **Petunjuk Praktikum Mikrobiologi Umum.** Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya. Malang. 58 hal
- Muliani *et al.* 2006. **Penapisan Bakteri yang Diisolasi dari Tambak Udang Sebagai Kandidat Probiotik pada Budidaya Udang Windu, *Penaeus monodon*.** Jurnal Riset Akuakultur ,1(1): 68-69
- Najiah Musa, Lee Seong Wei and Wendy Wee. 2008. **Phenotypic and Genotypic Characteristics of *Vibrio Harveyi* Isolated from Black Tiger Shrimp (*Penaeus Monodon*).** World Applied Sciences Journal, 3 (6): 885-902
- Nazir. 2005. **Metode Penelitian.** Ghalia Indonesia Cetakan 6. Bogor. 622 hal
- Nontji, A. 2005. **Laut Nusantara.** Djambatan. Jakarta. 367 hal
- Okano, S.,*et al.* 2007. **Characterization of *Vibrio harveyi* Bacteriophages Isolated from Aquaculture Tanks.** Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ., (56):5562
- Panigrahi, A., Kiron, J. Puangkaew, T. Kobayashi, S. Satoh, and H. Sugita. 2005. **The Viability of Probiotic Bacteria as Factor Influencing the Immune Response in Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*.** Aquaculture, (243) : 241-254
- Poernomo,A. 2004. **Technology of Probiotics to Solve the Problems in Shrimp Pond Culture and the Culture Environment.** Paper Presented in the National Symposium on Development and Scientific and Technology Innovation in Aquaculture,Semarang, (24): 27-29
- Prajitno. 2005. **Diktat Kuliah Parasit dan Penyakit Ikan.** Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang. 114 hal
- _____.2007.**Penyakit Ikan dan Udang: Bakteri.** UM Press. Malang.115 hal

- Purushothaman. A and Dr. S. Jayalakshmi. 2000. **Biodiversity in Mangrove Ecosystems, Floral Diversity : Bacteria and Fungi**. Centre of Advanced Study in Marine Biology, Annamalai University. 188-189 hal
- Rattanachuay Pattmarat, Duangporn Kantachote, and Prasert Suntainalert. 2007. **Selection of Proteolytic Bacteria with Ability to Inhibit *Vibrio harveyi* during White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Cultivation**. Songklanakarin J. Sci. Technol, 29(2) : 235-243
- Rengpipat Sirirat *et al.* 2003. **Enhanced Growth and Resistance to *Vibrio* Challenge in Pond-reared Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon* Fed a *Bacillus* Probiotic**. Chulalongkorn University, Bangkok jurnal, (55): 169–173
- Robertson, P. A. W., j. Calderon, L. Carrera, J. R. Stark, M. Zherdmant and B. Austin. 1998. **Experimental *Vibrio harveyi* Infections in *Penaeus vannamei* Larvae**. Dis. Aquat. Org, (22) : 151-155
- Rukyani A., P. Taufik, dan Taukhid. 1992. **Penyakit Kunang-Kunang (*Luminescent Vibriosis*) di Hatchery Udang Windu & Cara Penanggulangannya**. Primadona. Bendel Kedua. Edisi April. Jakarta. Hal 61
- Souza *et al.* 2006. **Chemical and Microbiological Characterization of Mangrove Sediments After a Large Oil-Spill In Guanabara Bay - Rj – Brazil**. Brazilian Journal of Microbiology, (37):262-266
- Sudha Nair, Sasirekha N, Appunu C, Bharathkumar S, Loganathan P, Rameshkumar N, Sridhar R, Subathra G and V. R. Prabhavathy. 2007. **Microbial Diversity in Mangrove Ecosystem**. World J Microbiol Biotechnol, 24(3): 387-394.
- Sumarsih, S. 2003. **Diktat Kuliah Mikrobiologi Dasar**. Jurusan Ilmu Tanah Fakultas Pertanian UPN"Veteran". Yogyakarta, 4(32): 1-116.
- Surakhmad, W. 1998. **Pengantar Penelitian Ilmiah**. Penerbit Tarsito. Bandung. 286 hal
- Suryati *et al.* 2003. **Performances of Tiger Shrimp Culture in Environmentally Friendly Ponds**. Research Institute for Coastal Fisheries. Indonesian jurnal of Agricultural Science, 4(2): 48-55
- Suwanto,A. 2002. **Strategi Baru dalam Mengendalikan Penyakit Infeksi :Memahami Bahasa Bakteri**. <http://kompas cyber media.com>. Diakses pada tanggal 19 Desember 2008 jam 10.WIB
- Varnaitė, R., Algimantas Paskevicius and Vita Raudoniene. 2008. **Cellulose Degradation in Rye Straw by Micromycetes and Their Complexes**. Ekologija, 54(1):29-31.

Verschuere. L., Rombaut, G. Sorgeloos, P. and Verstraete, W., 2000. **Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture**. Microbiology and Molecular Biology review, (64): 655 – 671

Wikipedia. 2008. **Gram Negatif**. <http://id.wikipedia.org/wiki/Gram-negatif>. Diakses pada tanggal 12 Juli 2008 Jam 09.00 WIB

Zhong yingbin, Xiao-Hua Zhang, Jixiang Chen, Zhenghao Chi, Boguang Sun, Yun Li and Brian Austin .2006. **Overexpression, Purification, Characterization, and Pathogenicity of *Vibrio harveyi* Hemolysin VHH**. American Society for Microbiology, 74(10) : 6001-6005

