

## UJI PATOGENITAS BAKTERI *Pseudomonas* sp. PADA UDANG VANAME (*Litopenaeus vannamei*) SEBAGAI KANDIDAT PROBIOTIK

### Pathogenicity Test of *Pseudomonas* sp. in White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as A Probiotic Candidate

Ismi M. Habib Pahlawi<sup>1\*</sup>, Woro Hastuti Satyantini<sup>2</sup> dan Sudarno<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga, Surabaya

<sup>2</sup>Departemen Manajemen Kesehatan Ikan dan Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga, Surabaya

\*habib.pahlawi21@gmail.com

#### Abstrak

Penelitian ini bertujuan mengetahui tingkat kematian udang vaname yang diinfeksi bakteri *Pseudomonas* sp. Bakteri *Pseudomonas* sp. diisolasi dari sedimen tambak udang. Uji patogenitas menggunakan udang vaname (7-9 gram) yang diinfeksi bakteri *Pseudomonas* sp. dengan kepadatan  $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^6$ ,  $10^8$  sel/ml secara intramuscular sebanyak 0,1 ml/ekor. Perlakuan kontrol diinfeksi menggunakan NaCl fisiologis sebanyak 0,1 ml/ekor. Tingkat mortalitas dan gejala klinis diamati setiap 6 jam pada 24 jam pertama dan selanjutnya selama 24 jam hingga 10 hari. Hasil yang diperoleh dari uji patogenitas bakteri *Pseudomonas* sp. pada udang vaname menunjukkan tingkat kematian sebesar 0% pasca infeksi. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri *Pseudomonas* sp. tidak menyebabkan kematian pada udang vaname. Gambaran gejala klinis yang ditunjukkan berupa hepatopankreas berwarna hijau kehitaman dengan tekstur yang padat dan menunjukkan kenampakan yang sama dengan perlakuan kontrol. Warna tubuh udang vaname setelah diinfeksi bakteri *Pseudomonas* sp. menunjukkan gambaran yang sama dengan kontrol yaitu berwarna putih transparan. Karapas dan ekor udang vaname setelah diinfeksi menunjukkan tidak adanya kerusakan yang disebabkan oleh infeksi bakteri *Pseudomonas* sp., gambaran tersebut menunjukkan kenampakan yang sama dengan perlakuan kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri *Pseudomonas* sp. tidak patogen terhadap udang vaname dan infeksi bakteri *Pseudomonas* sp. tidak berpengaruh terhadap perubahan morfologi makroskopis dan tingkah laku.

Kata kunci: Patogenitas, Gejala klinis, *Pseudomonas* sp., Udang vaname, Kematian

#### Abstract

This research aims to determine the mortality of vannamei shrimp infected by *Pseudomonas* sp. bacteria isolated from sediment of shrimp pond. Pathogenicity test was by using vannamei shrimp (7-9 grams) with a density of  $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^6$ ,  $10^8$  cells/ml intramuscularly. The control treatment was infected by using a physiological NaCl of 0.1 ml. The rate of mortality and clinical symptoms were observed for the first of 6 hours for 10 days. The results from the pathogenic test of *Pseudomonas* sp. in vannamei showed that 0% post infection of mortality rate. This was indicating that the *Pseudomonas* sp. bacteria did not cause death in vannamei shrimp. The clinical symptoms showed in the form of blackish-green hepatopancreas with a dense texture. That clinical symptom had the same appearance as the control treatment. The color of vannamei body showed a white color and so with the control treatment. Carapace and tail showed no damage to treatment and control treatment. This indicated that the bacteria *Pseudomonas* sp. did not cause death to vannamei shrimp and bacterial infections. *Pseudomonas* sp. did not affect morphological changes in macroscopic and behavior.

Keywords : Pathogenicity, Clinical symptoms , *Pseudomonas* sp., White shrimp, Mortality

#### PENDAHULUAN

Budidaya udang merupakan sektor perikanan yang berperan sebagai penyumbang devisa non-migas yang besar bagi negara (Budiardi *et al.*, 2013). Pada budidaya udang vaname, lingkungan merupakan faktor yang mempengaruhi kelangsungan hidup udang. Pengelolaan lingkungan merupakan salah satu upaya

untuk mengatasi serangan penyakit pada budidaya udang vaname. Alternatif yang dapat dilakukan dengan menggunakan bakteri agen biokontrol. Bakteri ini bisa didapat dari lingkungan budidaya udang yang memiliki kesesuaian habitat dengan udang vaname. *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas fluorescens*, dan *Pseudoalteromonas haloplanktis* merupakan

mikroorganisme yang diketahui dapat mencegah penyakit pada ikan dan udang (Kamei dan Isnansetyo, 2003; Verschuere *et al.*, 2000).

Bakteri *Pseudomonas* sp. merupakan bakteri Gram negatif yang mampu menghasilkan senyawa bakteriosin dan senyawa antibiotik untuk menghambat dan menekan bakteri patogen (Spanggaard *et al.*, 2001; Kamei dan Isnansetyo, 2003). *Pseudomonas* sp. juga mampu menghasilkan enzim kitinase. Enzim kitinase bekerja sebagai katalisator pada proses penguraian polimer kitin pada lapisan pelindung tubuh ikan menjadi unit monomer yang lebih sederhana (Mangunwardoyo *et al.*, 2009). Selain itu bakteri *Pseudomonas* sp. mampu memproduksi beberapa enzim seperti protease, amilase, lipase dan selulase yang dapat mengurai protein, karbohidrat dan lemak menjadi senyawa yang lebih sederhana, sehingga diharapkan bakteri *Pseudomonas* sp. dapat dikembangkan sebagai bakteri kandidat probiotik.

Menurut penelitian Patria (2015) dan Saputra (2015), bakteri *Pseudomonas* sp. memiliki kemampuan dalam memproduksi enzim ekstraselular maupun kemampuan antagonis terhadap bakteri *Vibrio harveyi*. Sebelum bakteri *Pseudomonas* sp. ini dikembangkan sebagai bakteri kandidat probiotik, perlu dilakukan pengujian lanjutan untuk mengetahui apakah bakteri *Pseudomonas* sp. dapat menyebabkan kematian tinggi atau tidak bila diaplikasikan pada udang vaname melalui uji patogenitas.

## METODOLOGI

### Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan di Tropical Disease Center (TDC) Universitas Airlangga. Pemeriksaan patogenitas bakteri *Pseudomonas* sp. dilakukan di Laboratorium Fakultas Perikanan dan Kelautan (FPK), Universitas Airlangga Surabaya pada bulan April-Juni 2017.

### Materi Penelitian

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini antara lain 20 akuarium berukuran 50x35x40 cm<sup>3</sup>, aerator, 20 batu aerasi, 20 buah selang aerator, dua bak tandon, cawan petri, tabung reaksi, *microtube*, *micropipet*, rak tabung reaksi, erlenmeyer, rak *microtube*, jarum ose, bunsen, spuit ukuran 1 ml, *hand glove*, masker, kertas label, pH meter, wadah pakan, baskom, timbangan analitik, refraktometer, termometer, DO meter, inkubator, spektrofotometer, vortex, *autoclave*, kulkas steril, kapas, aluminium foil dan plastik wrap.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu 200 ekor udang vaname dengan berat 7 – 9 gram, isolat murni bakteri *Pseudomonas* sp. koleksi FPK Unair, TSA (*Tryptone Soy Agar*), TSB (*Tryptone Soy Broth*), larutan NaCl Fisiologis, NaCL, standar Mc Farland, akuades, air laut steril, alkohol, klorin, Natrium Thiosulfat, pelet udang, dan es batu.

### Rancangan Penelitian

Isolat bakteri *Pseudomonas* sp. dengan kepadatan 10<sup>2</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>6</sup>, dan 10<sup>8</sup> sel/ml serta larutan NaCl fisiologis diinjeksikan sebanyak 0,1 ml pada udang vaname.

### Prosedur Kerja

#### Kultur Isolat Bakteri *Pseudomonas* sp.

Media yang digunakan untuk kultur bakteri *Pseudomonas* sp. adalah TSA. Pembuatan media dilakukan dengan melarutkan media TSA pada erlenmeyer sebanyak 40 g/L akuades sesuai petunjuk dan ditambahkan NaCl 15 g/l. Setelah itu media TSA disterilisasi dengan menggunakan *autoclave*. Media TSA yang sudah disterilisasi dituangkan pada cawan petri dan ditunggu hingga dingin dan mengeras.

Isolat *Pseudomonas* sp. kemudian diinokulasikan di media. Inokulasi bakteri menggunakan metode gores atau *streak*. Selanjutnya inokulum bakteri disimpan di inkubator pada suhu 30° C selama 24 jam. Bakteri yang tumbuh selanjutnya diinokulasikan pada media TSB sebanyak satu ose.

Bakteri yang tumbuh ditandai dengan perubahan media TSB menjadi lebih keruh, kemudian di panen dengan cara di *centrifuge* pada kecepatan 5.400 rpm selama 5 menit.

Selanjutnya supernatan dibuang dan ditambahkan larutan NaCl fisiologis kemudian diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 550 nm untuk mengetahui pertumbuhan atau kepadatan sel bakteri. Kepadatan bakteri yang diperlukan sesuai dengan perlakuan diperoleh dengan cara pengenceran (Chau *et al.*, 2011) dari jumlah kepadatan bakteri yang terukur sebelumnya pada spektrofotometer.

### Persiapan Udang Uji

Udang vaname didatangkan dari tambak semi intensif di Instalasi Budidaya Air Payau Lamongan, Lamongan yang berukuran rata-rata 7-9 gram, diaklimatisasi selama 5-7 hari. Udang vaname dipelihara di dalam akuarium (50x35x40 cm<sup>3</sup>) dengan kepadatan 10 ekor/akuarium dengan volume 35 liter dan setara sekitar 300 ekor/m<sup>3</sup> (Wasielesky *et al.*, 2006). Selama budidaya, udang diberi pakan berupa pakan udang komersial.

### Uji Patogenitas Pada Udang Vaname

Udang vaname terlebih dahulu dibius menggunakan suhu rendah. Teknik injeksi bakteri pada udang vaname secara intramuscular pada abdomen segmen ketiga (Chau *et al.*, 2011).

Volume injeksi yang digunakan adalah 0,1 ml/ekor menggunakan spuit berukuran 1 ml. Pemeliharaan udang vaname dilakukan selama 10 hari dan diberi pakan pelet komersial. Pengamatan kematian dan gejala klinis dicatat setiap enam jam sekali pada 24 jam pertama, selanjutnya setiap 24 jam sekali hingga hari ke-10 (akhir penelitian).

Perhitungan Tingkat Mortalitas dan LD<sub>50</sub> udang vaname dihitung pada akhir pemeliharaan. Menurut Effendie (1997) tingkat mortalitas udang vaname dapat dihitung dengan persamaan berikut :

$$Z = \frac{Mt}{Mo} \times 100\%$$

Keterangan :

Z : Tingkat Mortalitas (%)

Mt : Jumlah udang vaname yang mati (ekor)

Mo : Jumlah udang vaname yang hidup (ekor)

Nilai LD<sub>50</sub> didapat menggunakan metode aritmatik Reed dan Muench (1938). Metode ini menggunakan nilai-nilai kumulatif sebagai dasar perhitungan. Nilai kumulatif diperoleh dari kematian udang vaname selama rentan waktu pemeliharaan.

Penentuan LD50 didapat berdasarkan persamaan berikut :

$$\text{Selang Proporsi} = \frac{\text{kematian diatas } 50\% - 50}{\text{kematian diatas } 50\% - \text{kematian dibawah } 50\%}$$

Sehingga LD50 didapat dari persamaan berikut:

$$\text{LD50} = \text{Log Konsentrasi dibawah } 50\% + \text{Selang Proporsi}$$

### Analisis Data

Data hasil uji patogenitas bakteri *Pseudomonas* sp. pada udang vaname (*Litopanaeus vannamei*) yang diperoleh pada penelitian ini berupa data kuantitatif dan kualitatif. Data tersebut dianalisis secara deskriptif dan disajikan secara naratif dengan tabel dan gambar.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari hasil penelitian uji patogenitas didapatkan data kematian udang vaname yang diinfeksi bakteri *Pseudomonas* sp. 10<sup>2</sup> – 10<sup>8</sup> sel/ml sebesar 0%. Data kematian dapat dilihat pada Tabel 1. Pada penelitian ini udang yang diinfeksi bakteri *Pseudomonas* sp. tidak menunjukkan adanya kematian di semua perlakuan hingga akhir pemeliharaan. Kondisi tersebut diduga karena produk ekstraseluler yang dikeluarkan oleh bakteri *Pseudomonas* sp. tidak sampai menyebabkan kematian.

Menurut Mangunwardoyo *et al.* (2009), bakteri *Pseudomonas* sp. mampu menghasilkan enzim kitinase yang merupa-

kan katalisator pada proses penguraian polimer kitin pada lapisan pelindung tubuh ikan nila.

Tabel 1. Data kematian udang vadame (*Litopenaeus vannamei*).

Perlakuan	Hari ke-										Kematian (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
P0 (kontrol NaCl fisiologis)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P1 (10 <sup>2</sup> sel/ml bakteri <i>Pseudomonas</i> sp.)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P2 (10 <sup>4</sup> sel/ml bakteri <i>Pseudomonas</i> sp.)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P3 (10 <sup>6</sup> sel/ml bakteri <i>Pseudomonas</i> sp.)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P4 (10 <sup>8</sup> sel/ml bakteri <i>Pseudomonas</i> sp.)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Infeksi bakteri *Pseudomonas* sp. dengan kepadatan mencapai 10<sup>8</sup> sel/ml masih mendukung kelangsungan hidup udang vaname. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri *Pseudomonas* sp. tidak termasuk bakteri patogen. Menurut Todar (2002), bakteri patogen adalah bakteri yang mampu menyebabkan sakit hingga kematian pada hewan uji.

Hasil pengamatan gejala klinis udang vaname yang diinfeksi bakteri *Pseudomonas* sp. dengan dosis 10<sup>2</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>6</sup>, dan 10<sup>8</sup> sel/ml dan perlakuan kontrol menunjukkan bahwa pengamatan dari enam jam pertama sampai hari ke 10 pemeliharaan yaitu kenampakan tingkah laku dan gambaran morfologi makroskopis yang diinfeksi bakteri *Pseudomonas* sp. dengan dosis 10<sup>2</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>8</sup> sel/ml maupun kontrol (NaCl fisiologis) pada enam jam pertama sampai jam ke 24 menunjukkan pergerakan udang berenang pasif di dasar.

Pengamatan aktifitas berenang udang vaname Pada pengamatan hari ke dua sampai hari ke 10 udang vaname yang diinfeksi bakteri *Pseudomonas* sp. dengan dosis 10<sup>2</sup>-10<sup>8</sup> sel/ml memperlihatkan keaktifan berenang di kolom air maupun permukaan air. Respon makan udang vaname setelah diinfeksi bakteri *Pseudomonas* sp. dengan konsentrasi 10<sup>2</sup>,

10<sup>4</sup>, 10<sup>6</sup>, dan 10<sup>8</sup> sel/ml maupun kontrol (NaCl fisiologis) menunjukkan respon makan pasif pada pengamatan enam jam pertama. Udang vaname yang telah diinfeksi bakteri *Pseudomonas* sp. dengan dosis 10<sup>2</sup>-10<sup>8</sup> sel/ml maupun kontrol mengalami peningkatan respon makan selama pemeliharaan pada hari ke dua hingga hari ke-10.

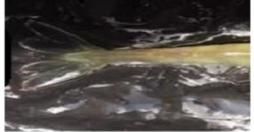
Gambaran morfologi makroskopis diamati melalui gambaran dari hepatopankreas, warna tubuh, kerusakan karapas dan ekor. Udang vaname setelah diinfeksi bakteri *Pseudomonas* sp. tidak menunjukkan adanya perubahan pada hepatopankreas. Menurut Soto-Rodriguez *et al.* (2015), udang vaname yang terinfeksi bakteri patogen akan mengalami gejala klinis berupa hepatopankreas akan berubah warna pada bagian pangkal menjadi kuning hingga keputihan.

Pada penelitian ini udang vaname yang diinfeksi bakteri *Pseudomonas* sp. dengan kepadatan 10<sup>2</sup>-10<sup>8</sup> sel/ml menunjukkan gambaran hepatopankreas berbentuk utuh dan berwarna hijau kehitaman. Perlakuan infeksi infeksi bakteri *Pseudomonas* sp. kepadatan 10<sup>2</sup>-10<sup>8</sup> sel/ml menunjukkan gambaran yang sama dengan perlakuan kontrol. Pada bagian tubuh udang vaname tidak menunjukkan adanya perubahan warna tubuh maupun rusaknya

karapas. Menurut Raja *et al.* (2015), udang vaname yang terindikasi serangan patogen akan berubah warna antara putih pucat

sampai kemerahan dan rusaknya karapas yang berfungsi sebagai pelindung tubuh udang vaname.

Tabel 2. Gambaran morfologi makroskopis udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) setelah diinfeksi bakteri *Pseudomonas* sp.

Perlakuan	Hepatopankreas	Warna Tubuh dan Karapas	Ekor
P0 (Kontrol Nacl fisiologis)			
P1 (10 <sup>2</sup> sel/ml Bakteri <i>Pseudomonas</i> sp.)			
P2 (10 <sup>4</sup> sel/ml Bakteri <i>Pseudomonas</i> sp.)			
P3 (10 <sup>6</sup> sel/ml Bakteri <i>Pseudomonas</i> sp.)			
P4 (10 <sup>8</sup> sel/ml Bakteri <i>Pseudomonas</i> sp.)			

Udang vaname yang diinfeksi bakteri *Pseudomonas* sp. 10<sup>2</sup>-10<sup>8</sup> sel/ml tidak mengalami perubahan warna tubuh dan menunjukkan gambaran yang sama dengan udang vaname pada perlakuan kontrol yaitu tubuh berwarna putih transparan. Udang vaname yang terinfeksi bakteri patogen akan mengalami perubahan warna dan kerontokan pada bagian ekor (Pratama *et al.*, 2014).

Pada pengamatan perubahan warna ekor dan kenampakan ekor udang vaname setelah diinfeksi bakteri *Pseudomonas* sp. dengan dosis 10<sup>2</sup>-10<sup>8</sup> sel/ml tidak menunjukkan adanya gejala kerontokan maupun perubahan warna pada ekor udang vaname. Pada perlakuan kontrol menunjukkan gambaran yang sama dengan perlakuan udang vaname yang diinfeksi bakteri *Pseudomonas* sp. menunjukkan ekor berwarna putih transparan dan tidak

adanya kerusakan pada ekor. Sama dengan gambaran udang pada perlakuan kontrol. Bakteri *Pseudomonas* sp. memiliki kemampuan menghasilkan enzim kitinase yang dapat mendegradasi zat kitin.

Kemampuan mendegradasi kitin dari bakteri *Pseudomonas* sp. diduga dapat menyebabkan rusaknya karapas pada tubuh dan kerusakan pada ekor udang vaname. Pada penelitian ini pasca infeksi bakteri *Pseudomonas* sp. tidak mengakibatkan lepasnya karapas dan kerusakan pada ekor.

Gejala klinis yang diamati pada oleh udang vaname yang diinfeksi bakteri *Pseudomonas* sp. selama pemeliharaan tidak menunjukkan gejala seperti yang disampaikan oleh Lavilla-Pitogo *et al.* (2000), bahwa *Pseudomonas* sp. merupakan jenis bakteri penyebab karapas, kaki jalan, kaki renang dan ekor udang windu mengalami kerontokan. Udang yang teresrang bakteri ini mengalami kerusakan terutama pada bagian sirip ekor (uropoda) yang mengakibatkan udang kesulitan berenang. Selain itu bakteri ini juga dapat menyebabkan aktivitas udang lemah, nafsu makan hilang dan rentan stres.

Bakteri *Pseudomonas* sp. mampu memproduksi enzim bakteriolitik yang dapat menguraikan suatu senyawa menjadi lebih sederhana. Mekanisme yang mampu menyebabkan kematian pada hewan uji dari bakteri *Pseudomonas* sp. dengan menghasilkan ekstraselular produk yaitu enzim kitinase. Enzim kitinase adalah enzim yang mampu menghidrolisis kitin menjadi monomer N-asetil-glukosamin (Herdyastuti *et al.*, 2009). Enzim ini yang diduga akan mendegradasi zat kitin yang ada pada karapas maupun ekor udang. Menurut Hardi *et al.* (2014), bakteri *Pseudomonas* sp. mampu memproduksi ekstraselular produk dengan menunjukkan gejala seperti sirip gripis, pendarahan kulit dan luka pada permukaan tubuh dan sisik lepas pada ikan.

Hal ini menunjukkan bahwa sistem pertahanan tubuh udang vaname masih mampu melawan zat asing yang masuk kedalam tubuh. Sehingga udang vaname

yang diinfeksi bakteri *Pseudomonas* sp. tidak menyebabkan kematian tinggi.

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah bakteri *Pseudomonas* sp. tidak mengakibatkan kematian pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*). Infeksi bakteri *Pseudomonas* sp. melalui penyuntikan secara intraperitoneal hingga dosis  $10^8$  sel/ml tidak berpengaruh terhadap tingkah laku dan perubahan morfologi udang vaname (*Litopenaeus vannamei*), sehingga dapat dikatakan bakteri *Pseudomonas* sp. tidak patogen.

### Saran

Saran yang dapat diberikan pada penelitian ini diharapkan adanya penelitian lanjutan mengenai pengembangan bakteri *Pseudomonas* sp. sebagai agen probiotik.

## DAFTAR PUSTAKA

- Budiardi, T., Muzaki A. dan Utomo, N.B.P., 2013. Produksi Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) Di Tambak Biocrete Dengan Padat Penebaran Berbeda. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 4 (2) :109 – 113.
- Chau, N.T.T., Hieu, N.X., Thuan, L.T.N., Matsumoto, M. and Miyajima, 2011. Identification and characterization of *Pseudomonas* sp. P9 antagonistic to pathogenic *Vibrio* spp. isolated from shrimp culture pond in Thua Thien Hue-Viet Nam, *J. Fac. Agr., Kyushu Univ*, 56 (1) :23-31.
- Effendie, M.I., 1997. *Biologi Perikanan*. Yayasan Pustaka Nusatama. Yogyakarta. hal. 130.
- Hardi, E. H., Catur, A.P. dan Gina, S., 2014. Toksisitas Produk Ekstraseluler dan Intraseluler Bakteri *Pseudomonas* sp. pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Veteriner*, 15 (3) : 312-322.
- Herdyastuti, N., Raharjo, J.T., Mudasir dan Matsjeh, S., 2009. Kitinase dan

- Mikroorganisme Kitinolitik: Isolasi, Karakterisasi dan Manfaatnya. *Indo J Chem* 9 (1):37-38,40.
- Kamei, Y. and Isnansetyo, A., 2003. Lysis of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* by 2,4-diacetylphloroglucinol produced by *Pseudomonas* sp. AMSN isolated from a marine alga. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 21: 71-74.
- Lavilla-Pitogo, C.R., Lio Po, G.D., Cruz-Lacierda, E.R., Alapide-Tendencia, E.V. and De la Peña, L.D., 2000. Diseases of penaeid shrimps in the Philippines. *Aquaculture Extension Manual*, 16 (2) :19-21.
- Mangunwardoyo, W., Ratih, I. dan Etty, R., 2009. Aktivitas Kitinase, Lesitinase dan Hemolisin Isolat dari Bakteri Ikan Nila (*Oreochromis niloticus* Lin.) Yang Dikultur Dalam Keramba Jaring Apung Waduk Jatiluhur, Purwakarta. *J. Ris. Akuakultur*, 4 (2) :257-265.
- Patria, M.W., 2015. Isolasi, Seleksi dan Identifikasi Bakteri Penghasil Enzim Protease, Lipase dan Amilase Dari Saluran Pencernaan Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) Asal Tambak Tradisional. Skripsi. Universitas Airlangga. Surabaya. hal. 36.
- Pratama, N.P. Slamet, B.P. dan Sarjito, 2014. Pemanfaatan Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia*) Untuk Penanggulangan Penyakit Bakteri (*Vibrio harveyi*) Pada Udang Windu. *Journal of Aquaculture Management and Technology*, 3 (4) :281-288.
- Raja, K., Gopalakrishnan, A., Singh, R. and Vijayakumar, R., 2015. Loose Shell Syndrome (LSS) in *Litopenaeus vannamei* grow-out Ponds and its Effect on Growth and Production. *Fish Aquac J.* 6 (1):151.
- Reed, L.J. and Muench, H., 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *The American Journal Of Hygiene*, 27: 493-497.
- Saputra, S.D., 2015. Uji Antagonis Isolat Bakteri Asal Sedimen Tambak Intensif dan Tradisional Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) Terhadap *Vibrio harveyi* Penyebab Penyakit Vibriosis. Skripsi. Universitas Airlangga. Surabaya. hal. 40.
- Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen, J., Sick, E., Pipper, C., Martinussen, T., Slierendrecht, W. and Gram, L., 2001. Potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout. *Environ. Microbiol.* 3, 755–765.
- Soto-Rodriguez, S.A., Gomez-Gil, B., Lozano-Olivera, R., Betancourt-Lozana, M. and Morales-Covarrubias, M.S., 2015. Field and Experimental Evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as The Causative Agent of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease of Culture Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Northwestern Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* 81. pp. 1-11.
- Todar, K., 2002. *Mechanisms of Bacterial Pathogenicity Endotoxins*. Todar Online Textbook of Bacteriology. University of Wisconsin-Madison Departement of Bacteriology.
- Verschuere, L., Rombout, G., Sorgeloos, P. and Verstraete, W., 2000. Probiotics Bacteria As Biocontrol Agents in Aquaculture. *App. Environ. Microbiol.* 64 (3) :655-671.
- Wasielecky, W. Jr., Atwood, H., Stokes, A. and Browdy, C.L., 2006. Effect of Natural Production in A Zero Exchange Suspended Microbial Floc Based Super-Intensive Culture System for White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 258 (4) :396–403.