

# PENAPISAN BAKTERI YANG DIISOLASI DARI TAMBAK UDANG SEBAGAI KANDIDAT PROBIOTIK PADA BUDI DAYA UDANG WINDU, *Penaeus monodon*

Muliani, Nurbaya, dan Muharijadi Atmomarsono

## ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mendapatkan bakteri probiotik untuk budi daya udang windu *P. monodon*. Penelitian meliputi beberapa tahapan yaitu (1) isolasi bakteri dari tambak udang; (2) uji daya hambat terhadap *Vibrio harveyi*; (3) karakterisasi secara fisiologi dan biokimia; (4) pertumbuhan bakteri pada beberapa konsentrasi NaCl; (5) pertumbuhan bakteri pada beberapa tingkat salinitas; (6) uji patogenisitas bakteri terhadap pascalarva udang windu; (7) uji tantang dengan *V. harveyi* dalam wadah pemeliharaan pascalarva udang windu; dan (8) analisis gen 16S-rRNA bakteri yang diisolasi dari tambak. Sedikitnya 14 isolat dari 2.228 isolat bakteri yang diisolasi dari tambak, potensial dijadikan probiotik pada budi daya udang windu. Sintasan udang windu tertinggi pada perlakuan yang menggunakan isolat BN2067. Isolat BT950 dan BT95 paling potensial menghambat pertumbuhan *V. harveyi* baik secara *In vitro* maupun *In vivo*. Hasil analisis gen 16Sr-RNA menunjukkan bahwa BT950 dan BT951 termasuk dalam kelompok *Brevibacillus* sp., sedangkan BN2067 termasuk dalam kelompok *Vibrio vulnificus* CMCP6 chr.

**ABSTRACT:** *Screening of isolated bacteria from shrimp ponds as probiotic candidate on tiger shrimp (Penaeus monodon) culture. By: Muliani, Nurbaya, and Muharijadi Atmomarsono*

*This experiment was aimed for finding-out probiotic bacteria on tiger shrimp P. monodon culture. The research included several steps i.e. 1) isolation of bacteria from tiger shrimp pond; 2) inhibition test of bacteria against V. harveyi; 3) biochemical and physiological characterization; 4) growth of bacteria at different concentration of NaCl; (5) growth of bacteria at different salinities; (6) pathogenicity test of bacteria to tiger shrimp post larvae, (7) challenge test of bacteria against V. harveyi in tiger shrimp culture media; (8) 16S-rRNA gene analysis of bacteria isolated from shrimp pond. Fourteen isolates of 2,228 isolates of bacteria isolated from tiger shrimp pond were potential for probiotic bacteria on tiger shrimp culture. The highest survival rate of tiger shrimp was obtained from those treated with BN2067 isolate. The potential isolates to inhibit V. harveyi both In vivo and In vitro assay were BT950 and BT951. Based on 16S-rRNA gene analysis, BT950 and BT951 isolates are considered to be Brevibacillus laterosporus, while BN2067 is considered to be Vibrio vulnificus CMCP6 chr.*

**KEYWORDS:** *probiotic, Penaeus monodon, V. harveyi, 16S-rRNA gene*

## PENDAHULUAN

Kasus kematian udang di tambak akibat serangan penyakit terutama oleh virus sampai saat ini masih terus terjadi. Hal ini tidak hanya terjadi di Indonesia, tapi juga di negara-negara lain seperti Thailand (Pasharawipas *et al.*, 1998;

Ruangpan *et al.*, 1998; Sukhumsirichart *et al.*, 1998), Taiwan (Peng *et al.*, 2001), Filipina (Albaladejo *et al.*, 1998; Loh *et al.*, 1998), India (Karunasagar, 2003; Vaseeharan *et al.*, 2003), Australia (Spann *et al.*, 1995), Jepang (Kono *et al.*, 2004), dan Amerika (Dhar *et al.*, 2001).

Penggunaan bakteri probiotik merupakan usaha penanggulangan penyakit baik pada ikan maupun udang yang paling banyak menarik perhatian berbagai kalangan pembudi daya (Haryanti *et al.*, 2001; Irianto, 2003; Muliani *et al.*, 2003; Muliani *et al.*, 2004; Panigrahi *et al.*, 2005). Berbagai merek produk bakteri probiotik telah beredar di pasaran dan telah digunakan oleh pembudi daya, namun demikian penyakit udang windu terutama yang disebabkan oleh WSSV masih tetap terjadi. Penggunaan bakteri probiotik di tambak untuk menanggulangi penyakit harus dilakukan secara hati-hati, karena tidak ada jaminan bahwa semua bakteri probiotik yang ada di pasaran dapat diaplikasikan di setiap lokasi. Hal ini karena setiap jenis bakteri probiotik memiliki persyaratan hidup dan tumbuh yang berbeda. Menurut Poernomo (2004), bahwa probiotik yang diaplikasikan ke dalam tambak harus mampu hidup di dalam tambak, mampu tumbuh, mampu berkembang biak, mampu berfungsi/bekerja aktif pada bidang masing-masing sesuai yang diharapkan.

Bakteri BY-9 yang diisolasi dari air laut kurang efektif jika diaplikasikan di tambak, karena memerlukan kondisi media khusus untuk menunjang pertumbuhan dan mempertahankan daya hambatnya terhadap bakteri *Vibrio* (Haryanti, 2003; komunikasi pribadi). Bakteri karang dan sedimen laut yang telah diisolasi pada tahun 2003 (Muliani *et al.*, 2003) mengalami penurunan aktivitas bakterisida setelah disimpan pada suhu  $-70^{\circ}\text{C}$  selama kurang lebih satu tahun. Berdasarkan hal tersebut, maka penelitian tentang penapisan bakteri yang diisolasi dari tambak yang mempunyai kemampuan menghambat *V. harveyi* dan sekaligus sebagai pengurai bahan organik sangat diperlukan. Selain itu, bakteri tersebut diharapkan dapat hidup dan berkembang di lingkungan tambak secara alami sehingga mudah diaplikasikan sebagai bakteri probiotik untuk budi daya udang windu di tambak.

## METODOLOGI

### Isolasi Bakteri Tambak

Lokasi pengambilan sampel. Pengambilan sampel tanah dan air untuk penapisan bakteri probiotik di tambak intensif, semi intensif, tradisional, dan tanah sulfat masam telah dilakukan di beberapa lokasi pertambakan di Sulawesi Selatan, yaitu: Barru, Bantaeng, Bone, Bulukumba, Jeneponto, Mamuju, Palopo,

Pinrang, Polmas, Sinjai, dan Wajo. Sampel yang telah dikumpulkan dibawa ke Laboratorium Patologi Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau, selanjutnya diisolasi bakterinya, kemudian dilakukan uji daya hambat terhadap *V. harveyi*.

**Media Isolasi.** Sampel air diencerkan secara seri (sampai  $10^{-2}$ ), sedangkan sampel udang dan sedimen terlebih dahulu digerus sebelum diencerkan secara seri (sampai  $10^{-4}$ ). Dari setiap pengenceran diambil 100 mL dan disebar pada media *Tryptic Soy Agar* (TSA) dalam cawan petri, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 1–2 hari. Koloni bakteri yang tumbuh selanjutnya diidentifikasi berdasarkan bentuk, warna, elevasi, dan ukuran koloni bakteri yang terbentuk (Atlas, 1997; Prescott *et al.*, 2002). Bakteri yang tumbuh dimurnikan dan dikultur pada media TSA yang dimiringkan, diinkubasi selama 48 jam, dan selanjutnya diuji daya hambatnya terhadap bakteri *V. harveyi*.

### Uji Daya Hambat Bakteri Kandidat Probiotik terhadap *V. harveyi*

Semua bakteri yang telah diisolasi dari tambak diuji daya hambatnya terhadap *V. harveyi* yang diisolasi dari udang windu. *V. harveyi* ditumbuhkan pada TCBSA selama 24 jam. Koloni tunggal yang tumbuh diambil dengan jarum ose dan disuspensikan dalam larutan garam fisiologis. Kemudian disebar pada media *Muller Hinton Agar* (MHA) dalam cawan petri (Ruangan & Tendencia, 2004) dan didiamkan selama beberapa menit hingga kering, selanjutnya di atas permukaan agar tersebut diinokulasi dengan bakteri tambak secara goresan. Biakan bakteri tersebut diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Isolat yang menghambat pertumbuhan *V. harveyi* ditandai dengan adanya zona bening di sekitarnya, disimpan untuk selanjutnya diuji lanjut untuk mengetahui karakteristiknya secara fisiologi dan biokimia.

### Karakterisasi Bakteri Kandidat Probiotik

Sifat fisiologi dan biokimia. Semua bakteri tambak yang menghambat *V. harveyi* dikarakterisasi secara fisiologi dan biokimia yang meliputi pewarnaan gram, oksidase, katalase, indol, motilitas, aktivitas amilolitik dan proteolitik, serta pertumbuhan pada suhu  $40^{\circ}\text{C}$  (Austin, 1993; Austin & Austin, 1993; Alsina & Blanch, 1994; Muir, 1996).

**Sensitifitas terhadap antibiotik.** Media yang dipakai untuk mempelajari resistensi antibiotik adalah MHA yang dimodifikasi dengan penambahan antibiotik gentamisin, kloramfenikol, eritromisin, furazolidon, dan rifampisin dengan konsentrasi masing-masing 25 mg/mL. Isolat-isolat bakteri tambak yang potensial menghambat *V. harveyi* digoreskan pada masing-masing media tersebut, lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 20–24 jam. Respon resistensi dari isolat dapat diketahui dengan mengamati pertumbuhan koloni di atas media tersebut.

**Pertumbuhan pada beberapa konsentrasi NaCl.** Pada tahapan ini dilakukan secara *in vitro* pada media MHA dalam cawan petri. Ke dalam media tersebut ditambahkan NaCl dengan konsentrasi 0%; 0,01%; 0,1%; 1%; dan 10%. Koloni bakteri tambak ditumbuhkan secara goresan media MHA. Selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama 24–48 jam.

**Pertumbuhan pada salinitas yang berbeda.** Wadah yang digunakan untuk uji pertumbuhan pada salinitas yang berbeda adalah akuarium kaca berkapasitas 3 L yang telah disterilkan dengan kaporit 150 mg/L dan dinetralsir dengan natrium tiosulfat 75 mg/L. Kadar garam air laut yang dicobakan adalah 0 ppt, 10 ppt, 20 ppt, 30 ppt, 40 ppt, dan 50 ppt. Setiap perlakuan diulang 3 kali ke dalam media tersebut kemudian diinokulasikan biakan bakteri probiotik dalam *nutrien broth* yang berumur 24 jam sebanyak 2 mL ( $\pm 10^4$  cfu/mL). Pengamatan populasi bakteri dilakukan setelah 24 jam.

#### **Uji Patogenisitas Bakteri Kandidat Probiotik terhadap Larva Udang Windu**

**Persiapan peralatan.** Semua peralatan dan air laut yang digunakan untuk uji patogenisitas disinfeksi dengan merendam dalam larutan kaporit 150 mg/L kurang lebih 3 hari, kemudian dinetralsir dengan penambahan *natrium tiosulfat* dengan konsentrasi 75 mg/L. Selanjutnya dicuci dengan air yang juga telah disterilkan dengan kaporit dan dinetralsir dengan *natrium tiosulfat* dengan konsentrasi tersebut.

**Hewan uji.** Pasca larva udang windu (PL13) yang diambil dari panti perbenihan di daerah Barru digunakan sebagai hewan uji. Sebelum digunakan pasca larva udang terlebih dahulu diadaptasikan selama 3–4 hari untuk menyesuaikan kadar garam media pemeliharaan dengan salinitas asal.

**Persiapan isolat bakteri dan uji patogenisitas.** Bakteri tambak yang menghambat *V. harveyi* dan potensial sebagai bakteri pengurai, selanjutnya diuji patogenisitasnya terhadap pascalarva udang windu. Satu lup dari masing-masing isolat ditumbuhkan dalam media *nutrien broth* secara terpisah. Kultur ditempatkan pada inkubator bergoyang selama 24 jam pada suhu 28°C. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 3.000 rpm pada suhu ruang. Pelet yang terbentuk kemudian diresuspensikan kembali dalam larutan garam fisiologis, selanjutnya diuji patogenisitasnya terhadap larva udang windu pada konsentrasi  $10^6$  cfu/mL (Hala, 1999) secara perendaman (Hameed, 1995). Wadah yang digunakan untuk uji patogenisitas adalah akuarium kaca berkapasitas 3 L. Setiap wadah diisi air laut steril yang bersalinitas 28 ppt sebanyak 2 L dan ditebari dengan pascalarva udang windu (PL13) sebanyak 30 ekor/wadah. Untuk menjaga ketersediaan oksigen, wadah pemeliharaan pascalarva udang windu, dilengkapi dengan aerasi, sedangkan untuk mempertahankan suhu, wadah ditempatkan pada ruang yang terkontrol dan ditutup dengan plastik hitam. Pemberian pakan dilakukan sebanyak dua kali per hari sebanyak 40% bobot tubuh. Patogenisitas bakteri kandidat probiotik diamati melalui kematian larva udang setelah 24 jam perendaman (Rengpipat *et al.*, 1998) dan dibandingkan dengan kontrol (tanpa infeksi bakteri kandidat probiotik). Penelitian dilakukan menggunakan rancangan acak lengkap dengan tiga kali ulangan (Steel & Torrie, 1981).

#### **Uji Tantang Bakteri *V. harveyi* dengan Bakteri Tambak**

**Uji tantang secara *in vitro*.** Uji tantang secara *in vitro* dilakukan dengan menggunakan media *nutrien broth* dalam labu erlenmeyer. Kepadatan bakteri *V. harveyi* dibuat menjadi  $10^5$  cfu/mL (Rengpipat *et al.*, 1998; Muliani *et al.*, 2003) dan kepadatan bakteri tambak 0,  $10^2$ ,  $10^4$ , dan  $10^6$  cfu/mL (Hala, 1999; Muliani *et al.*, 2003). Populasi *V. harveyi* dalam wadah diamati setelah 96 jam.

**Uji tantang secara *in vivo*.** Uji tantang *V. harveyi* dengan bakteri tambak secara *in vivo* dilakukan di Laboratorium Basah BRPBAP, Maros. Penelitian dilakukan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan tiga kali ulangan. Kepadatan bakteri *V. harveyi* dibuat menjadi  $10^5$  cfu/mL, sedang kepadatan bakteri kandidat probiotik 0,  $10^2$ ,  $10^4$ , dan  $10^6$  cfu/mL (Hala,

1999; Muliani *et al.*, 2003). Wadah yang digunakan untuk uji tantang secara *in vivo* adalah akuarium kaca berkapasitas 3 L yang diisi air laut steril salinitas 30 ppt sebanyak 2 L. Suspensi bakteri tambak (kandidat probiotik) dimasukkan ke akuarium 2 jam sebelum 30 ekor pascalarva udang windu dimasukkan. Setelah 6 jam, *V. harveyi* sebagai patogen (bakteri penantang) selanjutnya dimasukkan (Hala, 1999). Pengamatan pascalarva udang windu yang mati dilakukan setelah 96 jam. Data sintasan pasca larva udang windu dianalisis sidik ragam dan dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (Steel & Torrie, 1981).

### Identifikasi Bakteri

**Analisis 16S-rRNA.** Untuk menentukan identitas isolat bakteri tambak yang menghambat pertumbuhan *V. harveyi* dan mampu mengurai bahan organik dilakukan berdasarkan sekuen 16S-rRNA. Analisis mengikuti metode Marchesi *et al.* (1998) yang telah dimodifikasi oleh Suwanto *et al.* (2000) yaitu meliputi ekstraksi DNA, amplifikasi gen 16S-rRNA dengan PCR, *gene clean* dengan metode *glass milk*, *Cycle sequencing* dengan metode *BigDye*, presipitasi DNA, dan sekuensing dengan mesin *Sequenser*.

### HASIL DAN BAHASAN

**Isolat bakteri tambak.** Sedikitnya 2.228 isolat telah diskriming dan 14 isolat di antaranya potensial sebagai probiotik dan menghambat *V. harveyi* secara *in vitro* dalam cawan petri. Isolat yang paling baik menghambat pertumbuhan *V. harveyi* adalah isolat BT950 dan

isolat BT951 (Gambar 1). Kedua isolat ini diisolasi dari tambak udang di Kab. Bantaeng, Sulawesi Selatan.

**Uji fisiologi dan biokimia.** Di antara beberapa isolat yang menghambat dan bersifat *fermentative*, 14 isolat dipilih untuk dilakukan uji lanjut. Karakteristik secara fisiologi dan biokimia ke-14 isolat yang terpilih disajikan pada Lampiran 1.

Hasil uji resistensi ke-14 isolat bakteri kandidat probiotik terhadap beberapa antibiotik menunjukkan bahwa semua isolat resisten terhadap gentamisin, amoksilin, dan eritromisin pada dosis 25 mg/L dan 50 mg/L, namun sebagian isolat sensitif terhadap kloramfenikol, furazolidon, oksitetrasiklin, dan rifampisin baik pada dosis 25 mg/L, maupun pada dosis 50 mg/L. Beberapa isolat sensitif pada beberapa antibiotik pada dosis 50 mg/L, tapi resisten pada dosis 25 mg/L (Tabel 1). Tjahjadi *et al.* (1994) melaporkan bahwa di antara 45 isolat bakteri yang diisolasi dari laut dan air pemeliharaan larva udang windu semuanya bersifat resisten terhadap tetrasiklin tetapi hanya beberapa di antaranya yang resisten terhadap rifampisin. Beberapa isolat *Vibrio* yang diisolasi dari panti perbenihan udang bersifat sensitif terhadap gentamisin dan rifampisin (Hala, 1999). Hasil uji sensitivitas sedikitnya 15 isolat bakteri kandidat probiotik yang diisolasi dari air laut, karang, dan sedimen semuanya bersifat sensitif terhadap gentamisin, kloramfenikol, dan eritromisin pada dosis 25 mg/L, dan beberapa di antaranya resisten terhadap furazolidon pada dosis yang sama tapi sensitif pada dosis 50 mg/L (Muliani *et al.*, 2003). Sedangkan hasil uji



Gambar 1. Hasil uji daya hambat isolat BT950 dan BT951 terhadap *V. harveyi*  
Figure 1. Result inhibition of BT950 and BT951 isolates against *V. harveyi*

Tabel 1. Pertumbuhan bakteri kandidat probiotik pada media SWC yang dibubuhi antibiotik 25mg/mL dan 50 mg/mL

Table 1. The growth of probiotic candidate bacteria on SWC media supplemented with 25 mg/mL and 50 mg/mL of antibiotic

Kode Isolat <i>Isolate code</i>	Jenis antibiotik ( <i>Kinds of antibiotic</i> )						
	Am	Er	Rf	Ox	Gm	Fz	Ch
	25/50 (mg/mL)	25/50 (mg/mL)	25/50 (mg/mL)	25/50 (mg/mL)	25/50 (mg/mL)	25/50 (mg/mL)	25/50 (mg/mL)
MR55	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-
PK95	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
BR227	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-
LW374	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
JP532	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
BK662	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
BT950	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-
BT951	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-
KT1021	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
PR1080	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+
MJ1243	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
TK1438	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-
SJ1838	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
BN2067	+/+	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	-/-

Keterangan: Am= ampicilin, Er= eritromisin, Rf= rifampisin, Ox= oxitetrasiklin Gm= gentamisin, Fz= furazolidon, Ch= chloramphenicol, (+)= tumbuh, (-)= tidak Tumbuh

Note: Am= amphisilin, Er= eritromisin, Rf= rifampisin, Ox= oxytetracyclin, Gm= gentamisin, Fz= furazolidon, Ch= chloramphenicol, (+)= resistant, (-)= sensitive

resistensi terhadap 8 isolat bakteri filosfer yang diisolasi dari daun mangrove dilaporkan bahwa semua isolat resisten rifampisin dan gentamisin, 7 isolat sensitif terhadap rifampisin, 6 isolat resisten terhadap furazolidon dan kloramfenicol (Muliani *et al.*, 2004). Hal ini menunjukkan bahwa secara alami bakteri dapat bersifat resisten terhadap suatu antibiotik. Sifat resistensi tersebut diperlukan oleh suatu mikroorganisme untuk mempertahankan kehidupannya di alam. Menurut Chythanya *et al.* (1999), secara alami beberapa jenis mikroorganisme memiliki gen penyandi antibiotik yang dapat melindungi dirinya dari serangan antibiotik dari luar.

Pertumbuhan ke-14 isolat kandidat probiotik pada beberapa konsentrasi NaCl disajikan pada Tabel 2. Dari tabel tersebut terlihat bahwa semua isolat dapat tumbuh dengan baik pada konsentrasi NaCl 0%—10%, kecuali isolat BT950, BT951, dan BN2067 yang tidak terlalu bagus pertumbuhannya pada konsentrasi NaCl 10%. Dalam hasil penelitian sebelumnya

dilaporkan bahwa bakteri yang diisolasi dari daun mangrove yang potensial sebagai probiotik tumbuh bagus pada konsentrasi NaCl 0%—10% (Muliani *et al.*, 2004).

Pertumbuhan ke-14 isolat bakteri kandidat probiotik pada beberapa tingkatan salinitas menunjukkan bahwa beberapa isolat pertumbuhannya kurang baik pada salinitas 0 ppt (Tabel 3). Populasi isolat MR55 mencapai 10<sup>4</sup> cfu/mL, sedang isolat PK95 pertumbuhan tertinggi dicapai pada salinitas 0 ppt, dan cenderung semakin menurun seiring peningkatan salinitas. Beberapa isolat bakteri tumbuh optimum pada salinitas <20 ppt seperti PK95 dan BK662 dan beberapa di antaranya tumbuh optimum pada salinitas di atas 30 ppt. Namun demikian semua isolat dapat tumbuh pada semua tingkatan salinitas yang dicobakan, dengan demikian potensi isolat-isolat tersebut untuk dijadikan probiotik cukup tinggi, baik pada daerah yang bersalinitas rendah maupun bersalinitas tinggi atau baik pada musim hujan maupun musim kering.

Tabel 2. Petumbuhan bakteri kandidat probiotik pada beberapa konsentrasi NaCl

Table 2. The growth of probiotic candidate bacteria at several concentration of NaCl

Kode isolat Isolate code	Konsentrasi NaCl Concentration of Na Cl				
	0%	0.01%	0.00%	1%	10%
MR55	+	+	+	+	+
PK95	+	+	+	+	+
BR227	+	+	+	+	+
LW374	+	+	+	+	+
JP532	+	+	+	+	+
BK662	+	+	+	+	+
BT950	+	+	+	+	±
BT951	+	+	+	+	±
KT1021	+	+	+	+	+
PR1080	+	+	+	+	+
MJI 243	+	+	+	+	+
TK1438	+	+	+	+	+
SJ1838	+	+	+	+	+
BN2067	+	+	+	+	±

(+): tumbuh (*resistant*)

(-): tidak tumbuh (*sensitive*)

Patogenesis bakteri tambak terhadap pascalarva udang windu. Sebelum dilakukan uji tantang dengan *V. harveyi* dalam wadah pemeliharaan larva udang windu, ke-14 isolat diuji tingkat patogenesisnya terhadap pascalarva udang windu pada beberapa konsentrasi (Tabel 4). Pada tabel tersebut terlihat bahwa sampai  $6 \times 10^6$  cfu/mL semuanya tidak bersifat patogen terhadap pascalarva udang windu. Hal ini ditunjukkan oleh sintasan pascalarva udang windu pada semua perlakuan yang tidak berbeda nyata secara statistik ( $P > 0,05$ ) terhadap kontrol (tanpa pemberian bakteri). Sintasan pascalarva udang tertinggi pada perlakuan yang menggunakan isolat BN2067, kemudian berturut-turut isolat BT950, BT951, BR227, dan SJ1838, sedangkan sintasan terendah pada pemberian isolat KT1021 dan secara statistik berbeda nyata dengan BN2067. Hal ini menunjukkan bahwa semua isolat potensial dijadikan sebagai bakteri probiotik mengingat dua di antara isolat tersebut (BT950) dan BT951) juga memiliki daya hambat terhadap *V. harveyi*.

Beberapa peneliti terdahulu melaporkan bahwa pada umumnya bakteri yang diisolasi dari air laut dan tambak yang potensial sebagai biokontrol tidak bersifat patogen pada larva

udang windu. Rosa *et al.* (1997) mengemukakan bahwa pada kepadatan  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ , dan  $10^8$  cfu/mL selama 24 jam perendaman semua bakteri kandidat biokontrol yang diuji patogenesisnya tidak bersifat patogen pada larva udang windu. Demikian pula yang dihasilkan oleh Haryanti *et al.* (2000), isolat BY-9 sebagai biokontrol tidak bersifat patogen pada larva udang windu setelah inkubasi 12 jam pada konsentrasi  $10^5$  cfu/mL. Beberapa isolat bakteri kandidat probiotik yang disolasi dari sedimen karang (Muliani *et al.*, 2003) dan daun mangrove (Muliani *et al.*, 2004) juga dilaporkan tidak patogen pada larva udang windu.

Uji tantang bakteri tambak dengan *V. harveyi*. Dari 14 isolat bakteri kandidat probiotik yang telah diuji tingkat patogenesisnya terhadap pascalarva udang windu, 8 isolat di antaranya dilakukan uji tantang secara *in vitro* dengan *V. harveyi* dalam wadah erlenmeyer dan hasilnya menunjukkan bahwa dari 8 isolat yang terpilih sedikitnya ada 4 isolat yang paling baik menekan pertumbuhan *V. harveyi* yaitu dari tambak udang di daerah Bantaeng isolat (BT950 dan BT951), isolat asal Barru (BR227), dan isolat asal Bone (BN2067). Data hasil uji tantang secara *in vitro* disajikan

Tabel 3. Pertumbuhan bakteri kandidat probiotik pada salinitas yang berbeda

Table 3. The growth of probiotic candidate bacteria at different salinities

Kode isolat Isolate code	Pertumbuhan bakteri kandidat probiotik Growth of probiotic candidate bacteria (cfu/mL)					
	Salinitas (Salinity)					
	0 ppt	10 ppt	20 ppt	30 ppt	40 ppt	50 ppt
MR55	$1.0 \times 10^4$	$5.2 \times 10^3$	$5.2 \times 10^4$	$1.0 \times 10^4$	$1.0 \times 10^4$	$4.0 \times 10^4$
PK95	$5.7 \times 10^7$	$7.0 \times 10^5$	$8.0 \times 10^4$	$1.3 \times 10^5$	$2.2 \times 10^5$	$1.3 \times 10^4$
BR227	$8.2 \times 10^6$	$2.6 \times 10^7$	$4.0 \times 10^4$	$4.5 \times 10^4$	$1.1 \times 10^7$	$1.0 \times 10^6$
LW374	$4.8 \times 10^6$	$3.1 \times 10^7$	$2.0 \times 10^8$	$6.2 \times 10^6$	$1.3 \times 10^8$	$5.8 \times 10^7$
JP532	$1.0 \times 10^4$	$2.0 \times 10^4$	$1.0 \times 10^3$	$1.9 \times 10^3$	$4.0 \times 10^4$	$4.8 \times 10^3$
BK662	$1.2 \times 10^7$	$1.3 \times 10^7$	$1.0 \times 10^6$	$1.0 \times 10^6$	$1.8 \times 10^6$	$1.2 \times 10^6$
BT950	$1.0 \times 10^4$	$2.4 \times 10^4$	$1.5 \times 10^4$	$1.0 \times 10^4$	$3.0 \times 10^3$	$1.9 \times 10^4$
BT951	$1.0 \times 10^4$	$2.5 \times 10^4$	$1.0 \times 10^4$	$1.0 \times 10^4$	$1.0 \times 10^3$	$3.1 \times 10^3$
KT1021	$4.0 \times 10^5$	$1.3 \times 10^7$	$4.0 \times 10^4$	$8.1 \times 10^4$	$1.1 \times 10^7$	$3.2 \times 10^7$
PR1080	$8.0 \times 10^3$	$2.0 \times 10^2$	$1.0 \times 10^2$	$2.0 \times 10^2$	$2.1 \times 10^3$	$5.2 \times 10^3$
MJ1243	$8.1 \times 10^3$	$2.8 \times 10^3$	$3.1 \times 10^4$	$2.0 \times 10^2$	$2.5 \times 10^3$	$3.0 \times 10^2$
TK1438	$1.3 \times 10^3$	$1.6 \times 10^2$	$2.0 \times 10^1$	$2.0 \times 10^2$	$2.0 \times 10^2$	$2.2 \times 10^3$
SJ1838	$1.4 \times 10^5$	$2.1 \times 10^5$	$8.0 \times 10^4$	$1.2 \times 10^5$	$3.8 \times 10^6$	$4.8 \times 10^7$
BN2067	$3.1 \times 10^3$	$1.7 \times 10^5$	$7.4 \times 10^3$	$1.0 \times 10^3$	$3.2 \times 10^3$	$8.6 \times 10^3$

pada Gambar 2. Dari gambar tersebut terlihat bahwa isolat yang paling baik menekan pertumbuhan *V. harveyi* adalah isolat BT950 dan BT95. Jika dibanding dengan kontrol (tanpa penggunaan probiotik), populasi *V. harveyi* pada perlakuan yang menggunakan isolat tersebut jauh lebih rendah, bahkan kedua isolat ini mampu menekan perkembangan populasi *V. harveyi* hingga 33% untuk isolat BT950 pada kepadatan  $10^6$  cfu/mL dan 19% untuk isolat BT951 pada kepadatan yang sama setelah 96 jam ujiantang.

Hasil pengamatan terhadap sintasan benur windu PL17 pada ujiantang secara *in vivo* antara bakteri kandidat probiotik yang diisolasi dari tambak dengan *V. harveyi* dapat dilihat pada Tabel 5. Dari tabel tersebut terlihat bahwa sintasan pascalarva udang windu pada penggunaan beberapa bakteri kandidat probiotik tertinggi pada perlakuan yang menggunakan isolat SJ1838 pada konsentrasi  $10^4$  cfu/mL yaitu 97,89%; dan terendah pada perlakuan yang menggunakan BN2067 pada konsentrasi  $10^6$  cfu/mL yaitu 71,11%. Bahkan

sintasan pascalarva udang windu pada perlakuan tersebut lebih rendah dibanding dengan kontrol, namun demikian secara statistik tidak terdapat perbedaan yang nyata ( $P > 0,05$ ) di antara semua perlakuan. Sintasan pascalarva udang windu pada penelitian ini lebih tinggi dibanding hasil penelitian sebelumnya yang menggunakan *Alteromonas* sp. PL7 sebagai probiotik yaitu 41% (Abraham, 2004).

**Analisis gen 16S-rRNA.** Dari hasil analisis gen 16S-rRNA dapat diketahui bahwa isolat MR55, termasuk dalam kelompok *Bacillus firmus* strain NRL dengan indeks kedekatan sebesar 67,7%; isolat BR227 termasuk bakteri *Vibrio vulnificus* YJ016 DNA dengan indeks kedekatan 90,5%; isolate LW374 tidak dapat dilanjutkan ke analisis sekuen 16 SrRNA, karena pada saat ekstraksi genom tidak terekstrak. Isolat BT950 termasuk kelompok *Brevibacillus laterosporus* dengan indeks kedekatan sebesar 95,7%; isolat BT951 juga termasuk kelompok *Brevibacillus laterosporus* dengan indeks kedekatan sebesar 97,7%. Isolat PR1080 termasuk kelompok *Psychrobacter* sp. dengan indeks

Tabel 4. Rataan sintasan pascalarva udang windu (%) pada uji patogenisitas beberapa jenis bakteri kandidat probiotik yang diisolasi dari tambak udang

Table 4. Survival rate of tiger shrimp postlarvae (%) in pathogenicity test of several probiotic candidate bacteria isolated from shrimp pond

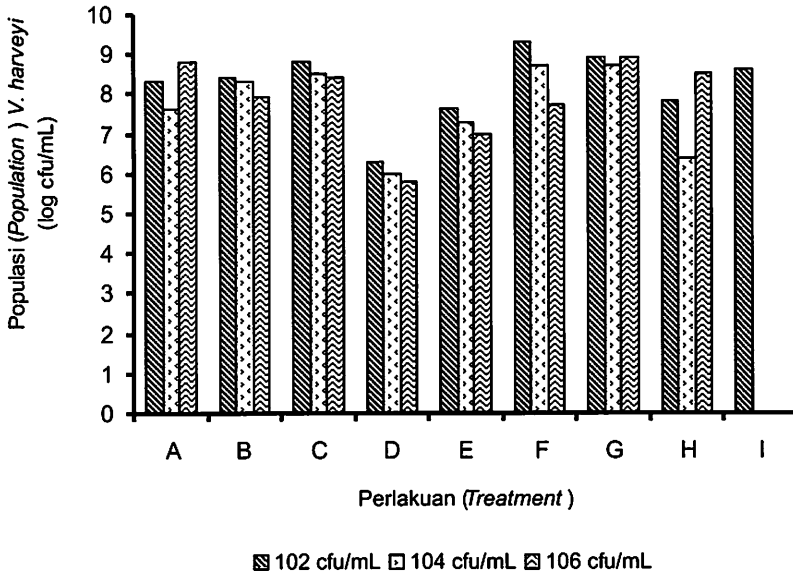
Perlakuan Treatments	Sintasan pascalarva udang windu Survival rate of tiger shrimp postlarvae (%)
MR55	94.67 <sup>ab</sup>
PK95	90.67 <sup>ab</sup>
BR227	96.00 <sup>ab</sup>
LW374	94.67 <sup>ab</sup>
JP532	94.67 <sup>ab</sup>
BK662	92.00 <sup>ab</sup>
BT950	97.33 <sup>ab</sup>
BT951	96.00 <sup>ab</sup>
KT1021	89.33 <sup>b</sup>
PR1080	94.67 <sup>ab</sup>
MJ1243	92.00 <sup>ab</sup>
TK1438	92.00 <sup>ab</sup>
SJ1838	96.00 <sup>ab</sup>
BN2067	98.67 <sup>a</sup>
Kontrol	92.00 <sup>ab</sup>

Tabel 5. Sintasan benur windu (%) dalam ujiantang secara *in vivo* antara bakteri kandidat probiotik dengan *V. harveyi*

Table 5. Survival rate of tiger shrimp postlarvae (%) *in vivo* challenged test among probiotic candidate bacteria with *V. harveyi*

Perlakuan Treatments	Sintasan larva udang windu Survival rate of tiger shrimp postlarvae (%)		
	10 <sup>2</sup> cfu/mL	10 <sup>4</sup> cfu/mL	10 <sup>6</sup> cfu/mL
MR55	94.44 <sup>a</sup>	79.89 <sup>a</sup>	82.22 <sup>a</sup>
BR227	93.33 <sup>a</sup>	91.00 <sup>a</sup>	72.22 <sup>a</sup>
LW374	86.67 <sup>a</sup>	74.44 <sup>a</sup>	93.33 <sup>a</sup>
BT950	85.56 <sup>a</sup>	97.79 <sup>a</sup>	90.00 <sup>a</sup>
BT951	95.67 <sup>a</sup>	87.78 <sup>a</sup>	86.67 <sup>a</sup>
PR1080	93.33 <sup>a</sup>	87.67 <sup>a</sup>	85.56 <sup>a</sup>
SJ1838	96.78 <sup>a</sup>	97.89 <sup>a</sup>	83.33 <sup>a</sup>
BN2067	94.44 <sup>a</sup>	96.78 <sup>a</sup>	71.11 <sup>a</sup>
Kontrol (Control)		94.44 <sup>a</sup>	





Keterangan: A= isolat MR55, B= isolat BR227, C= isolatLW374, D=isolat BT950, E= isolat BT951, F= isolat PR1080, G= isolat SJ1 838, H= isolat BN2067, dan I= kontrol (tanpa menggunakan bakteri probiotik)

Note: A= isolate MR55, B= isolateBR227, C= isolateLW374, D=isolate BT950, E= isolate BT951, F= isolate PR1080, G= isolate SJ1838, H= isolate BN2067, and I= control (without probiotic candidate bacteria)

Gambar 2. Pertumbuhan *V. harveyi* setelah 96 jam diujiantang secara *in vitro* dengan bakteri kandidat probiotik

Figure 2. The growth of *V. harveyi* after 96 hours *in vitro* challenged test with probiotic candidate bacteria

kedekatan 94,7%; isolate SJ1838 termasuk kelompok *Enterobacter* sp. dengan indeks kedekatan 95,5%, dan isolate BN2067 termasuk kelompok *Vibrio vulnificus* CMCP6 chr dengan indeks kedekatan 95,5%. Kedekatan bakteri kandidat probiotik yang diisolasi dari tambak udang dengan bakteri lain dapat dilihat pada gambar pohon filogenetik (Gambar 3). Dari gambar pohon filogenetik dapat dilihat bahwa beberapa isolate bakteri yang diisolasi dari tambak termasuk dalam kelompok bakteri *Bacillus*. Dengan demikian peluang bakteri-bakteri tersebut dijadikan sebagai bakteri probiotik sangat besar. Sebagaimana yang dilaporkan oleh Poernomo (2004) bahwa *Bacillus* sp. merupakan salah satu jenis bakteri yang telah diproduksi secara komersil dan diaplikasikan di lapangan sebagai probiotik.

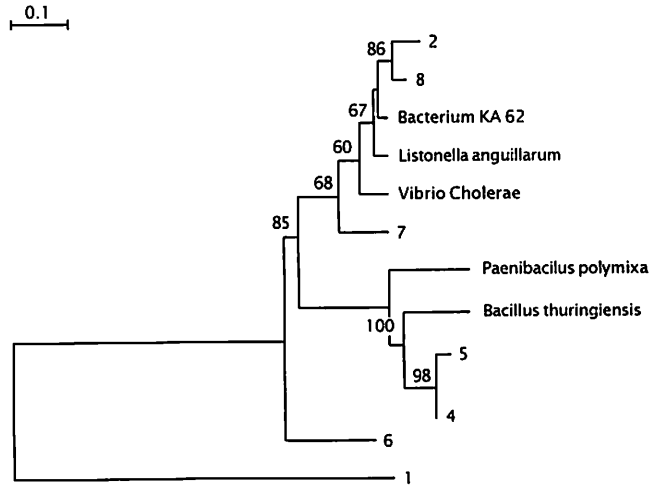
**KESIMPULAN**

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Koleksi beberapa isolate bakteri yang diisolasi dari tambak udang potensial sebagai probiotik.
2. Semua isolate yang potensial sebagai probiotik tidak patogen terhadap udang windu dan isolate yang paling baik menghambat pertumbuhan *V. harveyi* baik secara *in vitro* maupun *in vivo* adalah BT950 dan BT951, namun demikian sintasan benur windu tertinggi pada penggunaan isolate BN2067.
3. Beberapa isolate bakteri yang diisolasi dari tambak termasuk dalam kelompok *Brevibacillus* sp.

**UCAPAN TERIMA KASIH**

Ucapan terima kasih disampaikan kepada rekan-rekan peneliti dan teknisi baik yang terlibat langsung maupun tidak atas terlaksananya penelitian ini. Penelitian ini dibiayai oleh APBN T.A. 2004. dengan judul kegiatan "Riset Manajemen Kesehatan Ikan dan Ling-



Keterangan: 1 = isolat MR55, 2 = isolat BR227, 4 = isolat BT950, 5 = isolat BT951, 6 = isolat PR1080, 7 = isolat SJ1838, 8 = isolat BN2067

Note: 1 = isolat MR55, 2 = isolat BR227, 4 = isolat BT950, 5 = isolat BT951, 6 = isolat PR1080, 7 = isolat SJ1838, 8 = isolat BN2067

Gambar 3. Pohon filogenetik bakteri kandidat probiotik yang diisolasi dari tambak udang

Figure 3. Phylogenetic tree of candidate probiotic bacteria isolated from shrimp pond

kungan”, sub kegiatan “Pencegahan penyakit udang windu melalui penggunaan bakteri probiotik”.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Abraham, T.J. 2004. Antibacterial marine bacterium deter luminous vibriosis in shrimp larvae. Naga. *World Center Quarterly*, 27(3&4): 28—31.
- Alsina, M., and A.R. Blanch. 1994. A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *J. Appl. Bacteriol.*, 76: 79—85.
- Atlas, R.M. 1997. *Hand Book of Microbiological Media*. 2<sup>nd</sup> edition. CRC Press. Boca Raton. New York. London. Tokyo, 1,706 pp.
- Austin, B. 1993. *Methods in Aquatic Bacteriology*. John Willey and Sons. Chichester. New York. Brisbane. Toronto. Singapore, 425 pp.
- Austin, B. and D.A. Austin. 1993. Bacterial fish pathogens. *Disease in Farmed and Wildfish*. 2<sup>nd</sup> edition. New York. London. Toronto. Sydney. Tokyo. Singapore, 384 pp.
- Albaladejo, J.D., L.M. Tapay, V.P. Migo, C.G. Alfafara, J.R. Somga, S.L. Mayo, R.C. Miranda, K. Natividad, F.O. Magbanua, T. Itami, M. Matsumura, E.C.B. Nadala, P.C. 1998. Screening for shrimp viruses in the Philippines. In Flegel, T.W. (Ed.). *Advances in shrimp biotechnology. BIOTEC*. The National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand, p. 252—253.
- Chythanya, R., D.K. Nayak, and M.N. Venugopal. 1999. Antibiotic resistance in aquaculture. News from around the world. *Infofish International*, 6: 30—32.
- Dhar, A.K., M.M. Roux, and K.R. Klimpel. 2001. Detection and Quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and White Spot Syndrome Virus in shrimp using Real-Time quantitative PCR and SYBR green chemistry. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 2,835—2,845.
- Hala, Y. 1999. *Penggunaan Gen Penanda Molekular untuk Deteksi Pelekatan dan Kolonisasi Vibrio harveyi pada Larva Udang Windu (Penaeus monodon)*. Disertasi. Program Pascasarjana. IPB. Bogor, 91 pp.
- Hameed, A.S.S. 1995. Susceptibility of three *Penaeus* species to a *Vibrio campbelli*-like bacterium. *J. World Aqua. Soc.*, 26: 315—319.
- Haryanti, K. Sugama, S. Tsumura, and T. Nishijima. 2000. Vibriostatic bacterium isolated from seawater: Potentiality as probiotic agent in the rearing of *Penaeus*

- monodon* larvae. *Ind. Fish. Res. J.*, 6: 26—32.
- Haryanti, K. Sugama, S. Tsumura, and T. Nishijima. 2001. Enhance production of black tiger shrimp *Penaeus monodon* postlarvae by Probiotic bacterium *Alteromonas* sp. *Ind. Fish. Res. J.*, 6: 26—32.
- Irianto, A. 2003. *Probiotik Akuakultur*. Gajah Mada University Press, 125 pp.
- Karunasagar, I. 2003. *Application of Polymerase Chain Reaction for Detection of Shrimp Pathogens in India*. Department of Fishery Microbiology, University of Aquacultural Sciences, College of Fisheries, Mangalore-575 002, India, 2 pp.
- Kono, T., R. Savan, and T. Itami. 2004. Detection of white spot syndrome virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol. Methods*, 115: 59—65.
- Loh, P.C., E. Cesar, J.R.B. Nadala, L.M. Tapay, and Y. Lu. 1998. Recent developments in Immunologically-Based and cell culture protocols for the specific detection of shrimp viral pathogen. In Flegel TW. (Ed.). *Advances in shrimp biotechnology*. BIOTEC. The National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand, p. 255—259.
- Marchesi, J. R.T. Sato, A.J. Weightman, T.A. Martin, J.C. Fry, S.J. Hiom, and W.G. Wade. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-spesifik PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S-rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 795—799.
- Muir, P. 1996. *Identification of Vibrio and Pseudomonas Bacteria*. Department of Microbiology, Biomedical and Tropical Veterinary Science, James Cook University of North Queensland. Australia, 6 pp.
- Muliani, A. Suwanto, dan Y. Hala. 2003. Isolasi dan karakterisasi bakteri asal laut Sulawesi untuk biokontrol penyakit vibriosis pada larva udang windu (*Penaeus monodon* Fab.). *Hayati*, 10: 6—11.
- Muliani, Nurbaya, A. Tompo, dan M. Atmarsono. 2004. Eksplorasi bakteri filofosfer dari tanaman mangrove sebagai bakteri probiotik pada budidaya udang windu *Penaeus monodon*. *J. Pen. Per. Indonesia*, 2: 47—57.
- Panigrahi, A., V. 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.
- Pasharawipas, T., S. Sriurairatana, S. Direkbusarakom, Y. Donayadol, S. Thaikua, L. Ruangpan, and T.W. Flegel. 1998. Luminous *Vibrio harveyi* associated with tea brown gill syndrome in black tiger shrimp. In Flegel, T.W. (Ed.). *Advances in shrimp biotechnology*. BIOTEC. The National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand, p. 213—216.
- Peng, S.E., C.F. Lo, S.C. Lin, L.L. Chen, Y.S. Chang, K.F. Liu, M.S. Su, and G.H. Kou. 2001. Performance of WSSV-infected and WSSV-negative *Penaeus monodon* postlarvae in culture ponds. *Dis. Aquat. Org.*, 46: 165—172.
- 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, January 27—29, 2004, 24 pp.
- Prescott, L.M., J.P. Harley, and D.A. Klein. 2002. *Microbiology*. 5th edition. Mc Graw Hill. Boston Burr Ridge, IL Dubuque, IA Madison, WI New York, San Fransisco, Bangkok, Bogota, Caracas, Kualalumpur, Lisbon, London, Madrid, Mexico City, Milan, Montreal, Newdelhi, Santiago, Seoul, Singapore, Sydney, Taipei, Toronto, 1,026 pp.
- Rengpipat, S., S. Rukpratanporn, S. Piyatitivorakul, and P. Menasveta. 1998. Probiotics in Aquaculture: A case study of probiotics for larvae of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). In Flegel TW, (Ed.). *Advances in shrimp biotechnology*. BIOTEC. The National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, p. 177—181.
- Rosa, D., Zafran, I. Tufik, dan M.A. Girsang. 1997. Pengendalian *Vibrio harveyi* secara biologis pada larva udang windu (*Penaeus monodon*): I. Isolasi Bakteri Penghambat. *J. Pen. Per. Indonesia*, 3: 1—10.
- Ruangpan, L. 1998. Luminous bacteria associated with shrimp mortality. In Flegel T.W. (Ed.). *Advances in shrimp biotechnology*. BIOTEC. The National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand, p. 205—211.
- Ruangpan, L. and E.A. Tendencia. 2004. *Laboratory Manual of Standardized Methods for Antimicrobial Sensitivity Test for Bacteria*

- Isolated from Aquatic Animals and Environment*. Southeast Asian Fisheries Development Center. Aquaculture Department. Government of Japan Trust Fund, 55 pp.
- Spann, K.M., J.E. Vickers, and R.J.G. Lester. 1995. Lymphoid organ virus of *Penaeus monodon* from Australia. *Dis. Aquat. Org.*, 23: 127—134.
- Steel, R.G.D. and J.H. Torrie. 1981. *Principles and Procedures of statistics*. Biometrical Approach (2<sup>nd</sup> edition). International Student Edition. McGraw-Hill International Book Company, 633 pp.
- Sukhumsirichart, W., C. Wongteerasupaya, V. Boonsaeng, S. Panyim, S. Sriurairatana, B. Withyachumnarnkul, and T.W. Flegel. 1998. Genome organization and detection of Hepatopancreatic Parvovirus (HPV) from *Penaeus monodon* in Thailand. In Flegel, T.W. (Ed.). *Advances in shrimp biotechnology*. BIOTEC. The National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand, p. 261—262.
- Suwanto, A., Yogiara, D. Suryanto, I. Tan, and E. Puspitasari. 2000. Selected protocols. *Training Course on Advances in Molecular Biology Techniques to Assess Microbial Diversity*. Bogor, 28 pp.
- Tjahjadi, M.R., S.L. Angka, and A. Suwanto. 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: 347—352.
- Vaseeharan, B., R. Jayakumar, and P. Ramasamy, 2003. PCR-base detection of white spot syndrome virus in cultured and captured crustaceans in India. *Lett. Appl Microbiol.*, 37: 443—447.

Lampiran 1. Uji fisiologi dan biokimia bakteri kandidat probiotik yang diisolasi dari tambak udang

Appendix 1. *Physiological and biochemical test of candidate probiotic bacteria isolated from shrimp ponds*

Uji fisiologi dan biokimia <i>Physiological and biochemical tests</i>	Kode isolat ( <i>Code of isolate</i> )													
	MR	PK	BR	LW	JP	BK	BT	BT	KT	PR	MJ	TK1	SJ	BN
	55	95	227	374	532	662	950	951	1021	1080	1243	1438	1838	2067
Pewarnaan gram ( <i>Gram staining</i> )	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
Oksidase ( <i>Oxidase</i> )	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Katalase ( <i>Catalase</i> )	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Motilitas ( <i>Motility</i> )	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indol ( <i>Indole</i> )	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Uji VP ( <i>VP-test</i> )	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Pert. pada 40°C ( <i>Growth at 40°C</i> )	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Produksi gas ( <i>Gas from glucose</i> )	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Uji O-F ( <i>O-F Test</i> )	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-
Penyebaran ( <i>Swarming</i> )	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pendaran ( <i>Luminescence</i> )	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Produksi amilase ( <i>Amylase product</i> )	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-
Arginin dehidr/ <i>Arginine dehydr</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Lisin dekarb ( <i>Lysine decarb</i> )	+	+	NG	NG	NG	-	NG	+	-	NG	NG	+	+	-
Omitin dekarb ( <i>Ornithine decarb</i> )	+	+	NG	NG	NG	-	NG	+	-	NG	NG	+	+	-
Pert. pada etanol 95% ( <i>Growth at 95% ethanol</i> )	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
Serin ( <i>Serine</i> )	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Putrisin ( <i>Putriscine</i> )	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sukrosa ( <i>Sucrose</i> )	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+
Heptanoat ( <i>Heptanoate</i> )	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Xantin ( <i>Xanthine</i> )	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amonobutirat ( <i>Aminobutirate</i> )	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinosa ( <i>Arabinose</i> )	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Sellubiosa ( <i>Cellubiose</i> )	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Glukuronata ( <i>Glucuronate</i> )	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Ketoglutarat ( <i>Ketoglutarate</i> )	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-alanin ( <i>L-alanine</i> )	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-
L-leusin ( <i>L-leucine</i> )	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Propionat ( <i>Propionate</i> )	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-