

Skrining Kandidat Bakteri Probiotik dari Saluran Pencernaan Ikan Kerapu Berdasarkan Aktivitas Antibakteri dan Produksi Enzim Proteolitik Ekstraseluler

Subagiyo* dan Ali Djunaedi

Laboratorium Ilmu Kelautan, PS. Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro
Kampus Ilmu Kelautan – Tembalang – Semarang Telp 024 7474698
Email: subagiyo_kelautan@yahoo.co.id

Abstrak

Strategi penyehatan ikan secara terpadu merupakan salah satu upaya yang paling efektif dalam pengendalian penyakit serta perlindungan lingkungan pada budidaya akuatik. Pengembangan probiotik menduduki peran fungsional yang penting bersamaan dengan pengembangan vaksin dan immunostimulan. Penelitian ini bertujuan untuk menseleksi bakteri probiotik yang akan dikembangkan sebagai materi dasar untuk mengkonstruksi konsorsium probiotik dengan target fungsional di saluran pencernaan ikan kerapu. Salah satu kriteria seleksi ditetapkan berdasarkan desain konstruksi konsorsium gut probiotik yaitu kemampuan menghasilkan senyawa antibakteri terhadap bakteri pathogen dan kemampuan menghasilkan enzim pencernaan diantaranya adalah enzim proteolitik ekstraseluler. Penelitian ini dilakukan dengan metode eksplorasi dan eksperimen laboratorium. Ikan kerapu macan secara aseptik diambil saluran pencernaannya, kemudian dihancurkan menggunakan mortar. Penanaman bakteri dilakukan dengan metode pour-plate pada medium nutrient agar. Deteksi aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar menggunakan paper disk sedangkan deteksi produksi enzim proteolitik ekstraseluler dilakukan dengan metode tusukan pada media yang diperkaya dengan skim milk. Hasil seleksi berdasarkan kriteria seleksi yang telah ditetapkan diperoleh 8 isolat potensial untuk dapat dikembangkan sebagai konsorsium probiotik. Ke 8 isolat ini mempunyai kemampuan untuk menghasilkan senyawa antibakteri yang aktif terhadap 4 jenis vibrio (*V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. harveyi*, dan *V. anguillarum*) serta menghasilkan enzim proteolitik ekstraseluler yang diperlukan untuk mencerna senyawa yang bersifat protein yang merupakan komponen utama pakan ikan

Kata kunci: Probiotik, pengendalian penyakit, antibakteri, enzim proteolitik, saluran pencernaan, ikan kerapu

Abstract

The strategy to healthy fish in an integrated manner is one of the efforts that is the most effective to environmentally friendly disease control. The development of probiotics occupied the functional role that is important along with the development of the vaccine and immunostimulant. This research aimed to select the candidates of probiotic bacteria that will be developed as basic material to construct the probiotic consortium with the functional target in the digestion tract of the grouper fish. The one of selection criteria was appointed based on the construction of the gut probiotic consortium is the capacity to produce the antibacterial compound against the pathogen, and the capacity to produce proteolytic enzymes. The research was carried out with the exploration and experimental laboratory methods The intestine was removed from the fish of the tiger grouper, afterwards was destroyed by mortar. The planting of the bacteria was carried out with the pour-plate method in nutrient agar medium. Antibacterial activity was detection by agar diffusion method using paper disk, while the detection capability to produce extracellular proteolytic enzymes was carried out by using enrichment media with skim milk. The Results of selection obtained eight bacterial isolates that can be developed potentially as the consortium of gut probiotic. The eight bacterial isolates were able to produce antibacterial compounds (that was active against *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. harveyi*, and *V. anguillarum*) and extracellular proteolytic enzymes

Key words: Probiotic, diseases control, antibacteria, proteolytic enzyme, gastrointestinal tract, grouper

Pendahuluan

Ikan kerapu merupakan makanan yang budidaya komersial penting karena mempunyai laju populer di Asia Tenggara dan merupakan ikan pertumbuhan yang cepat, konversi pakan yang efisien,

dan nilai jual yang tinggi. (Luo et al., 2005; Yoshii et al., 2010) dan kemampuan adaptasi yang tinggi (Yoshii et al., 2010). Di Hongkong, Jepang, Singapura dan China ikan kerapu merupakan *live reef fish food* (LRFF) yang tergolong makanan mewah dengan nilai harga yang tinggi (Afero et al., 2009).

Pemenuhan kebutuhan ikan kerapu ini berasal dari sektor yaitu sektor perikanan tangkap dan sektor perikanan budidaya. Ekspor hasil perikanan tangkap terkendala oleh diberlakukannya *ecolabelling* yang diantarnya adalah mensyaratkan kegiatan penangkapan yang berwawasan lingkungan, diantaranya adalah berasal dari daerah tangkapan yang tidak termasuk di dalam zona overeksploitasi. Oleh karena itu sektor budidaya menjadi alternatif penting dalam penyediaan kebutuhan ikan. Proses budidaya ikan terkendala oleh adanya serangan penyakit. Pengendalian berbasis obat-obatan yang selama ini banyak dilakukan telah menjadi bumerang bagi ekspor produk budidaya. Di pasar global telah ditetapkan persyaratan diantaranya adalah harus bebas antibiotik. Oleh karena itu perlu dilakukan upaya untuk mengurangi aplikasi obat-obatan terutama antibiotik. Salah satu pendekatan efektif melalui strategi pencegahan penyakit secara terpadu. Probiotik merupakan salah satu strategi yang efektif bersama aplikasi vaksin dan immunostimulant (masing-masing mempunyai fungsional tersendiri dalam menyetatkan ikan dan memproteksi terhadap

serangan penyakit) dalam menyetatkan ikan budidaya sehingga mampu memproteksi diri teradap serangan penyakit. Probiotik memproteksi ikan budidaya melalui mekanisme menghasilkan senyawa kimia yang mempunyai aktivitas bakterisidal atau bakteristatik terhadap populasi bakteri lain, khususnya bakteri yang bersifat merugikan (termasuk pathogen) (Gomez et al., 2007). Keberadaan probiotik ini didalam usus inang (baik pada permukaan usus maupun didalam lumen berperan sebagai pelindung (*barier*) terhadap proliferasi (pertumbuhan) pathogen diantaranya melalui mekanisme produksi senyawa yang mampu menghambat pertumbuhan pathogen. Beberapa penelitian yang terkait dengan kerja probiotik menghambat pathogen ditunjukkan pada Tabel 1.

Selain itu probiotik juga berperan sebagai sumber nutrient dan enzim pencernaan. Beberapa penelitian membuktikan bahwa mikroorganisme mempunyai pengaruh yang menguntungkan dalam proses pencernaan pada hewan-hewan perairan yaitu memberikan kontribusi nutrisi, mikrobiota dapat berperan sebagai sumber makanan suplemen dan aktivitas mikrobial dalam saluran pencernaan dapat menjadi sumber vitamin dan asam amino esensial (Metges, 2000), mempengaruhi aktivitas pencernaan (Ghosh et al., 2002; Zhao et al., 2007; Geovanny & Shen, 2008; Gomez et al., 2008; Lehata et al., 2009). Secara ringkas peranan bakteri probiotik terhadap proses pencernaan ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 1. Jenis-jenis bakteri probiotik dan jenis bakteri pathogen yang dihambat

Jenis bakteri	Jenis pathogen yang dihambat	Pustaka
<i>B. subtilis</i> BT23	<i>V. harveyi</i> ,	Vaseeharan & Ramasamy (2003)
<i>Aeromonas sobria</i>	<i>Lactococcus garvieae</i> <i>Streptococcus iniae</i>	Brunt & Austin (2005)
<i>Bacillus subtilis</i> UTM 126	<i>V. alginolyticus</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. harveyi</i> .	Balcázar & Rojas-Luna, (2007)
<i>Vibrio alginolyticus</i> UTM 102, <i>Bacillus subtilis</i> UTM 126, <i>Roseobacter gallaeciensis</i> SLV03, <i>Pseudomonas aestumarina</i> SLV22	<i>V. parahaemolyticus</i>	Balcázar et al., (2007)
<i>Bacillus licheniformis</i>	Total <i>vibrio</i>	Li et al., (2007)
<i>Paenibacillus</i> spp.	<i>V.harveyi</i>	Ravi et al., (2007)
<i>Bacillus cereus</i> , <i>Paenibacillus polymyxa</i>	<i>Vibrio</i> spp.	
<i>S. phocae</i> , <i>E. faecium</i>	<i>Vibrio</i>	Swaim et al., (2009).
<i>Shewanella</i>	<i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. alginolyticus</i> .	Zadeh et al., (2009)
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>L. garvieae</i>	Sequieros et al. (2010)

Tabel 2. Jenis bakteri probiotik dan peranannya dalam proses pencernaan

Jenis bakteri probiotik	Peranan dalam proses pencernaan	Pustaka
<i>Bacillus</i> sp	meningkatkan koefisien daya cerna phosphate, asam amino dan asam lemak dalam pakan	Lin <i>et al.</i> (2004)
<i>Bacillus</i>	mempengaruhi aktivitas enzim pencernaan meningkatkan aktivitas protease dan amilase,	Geovanny & Shen, (2008)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Meningkatkan plasma alkaline phosphatase activity	Panigrahi <i>et al.</i> (2009)

Oleh karena itu pengembangan probiotik di bidang budidaya akuatik perlu untuk terus dilakukan. Pada penelitian ini dilakukan skrining untuk mendapatkan jenis-jenis bakteri yang dapat dikembangkan untuk mengkonstruksi konsorsium probiotik. Desain seleksi didasarkan pada target fungsional probiotik di saluran pencernaan diantaranya mampu memproteksi ikan melalui mekanisme produksi senyawa antibakteri terhadap patogen, serta mampu berkontribusi terhadap proses pencernaan terutama komponen protein yang merupakan komponen utama pakan ikan yaitu melalui mekanisme produksi enzim pencernaan proteolitik ekstraseluler.

Materi dan Metode

Sampel ikan kerapu yang digunakan dalam penelitian ini adalah jenis ikan kerapu macan yang berasal dari unit pembenihan ikan kerapu, Balai Budidaya Air Payau (BBAP) Situbondo. Sampel dibersihkan bagian luar tubuhnya dengan desinfektan untuk mematikan mikrobia. Kemudian secara aseptik dilakukan pembedahan dan pengambilan saluran pencernaan ikan, selanjutnya dicuci dengan air laut steril dan dihancurkan secara aseptik menggunakan mortar.

Isolasi bakteri

Isolasi bakteri saluran pencernaan dilakukan dengan teknik *pourplate* pada media nutrisi agar. Satu gram homogenat saluran pencernaan disuspensikan ke dalam 9 mL air laut steril kemudian dibuat seri pengenceran hingga 10^{-8} . Masing masing seri pengenceran ditanam pada media nutrisi agar kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 35 °C.

Seleksi kandidat probiotik

Seleksi dilakukan secara kualitatif berdasarkan kemampuan menghasilkan senyawa antibakteri dan enzim proteolitik ekstraseluler

Uji kemampuan menghasilkan senyawa antibakteri

Seleksi koloni bakteri yang mempunyai aktivitas antibakteri dilakukan dengan teknik difusi

agar menggunakan *paper disc* (Kanmani *et al.*, 2010). Limabelas mL nutrisi agar yang telah dicampur dengan bakteri uji pada konsentrasi 10^5-10^6 CFU/ml dituang ke dalam petridish steril kemudian paper disk steril yang telah dicelupkan ke dalam supernatant kultur cair isolat bakteri diletakan dengan cara ditekan ke atas media nutrisi agar. Inkubasi pada 35°C selama 24 jam. Aktivitas antibakteri ditunjukkan dengan terbentuknya zona jernih. Bakteri vibrio patogen yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri ini adalah bakteri *Vibrio harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum*, *V. alginolyticus* dan *V. vulnificus*.

Uji aktivitas produksi enzim proteolitik

Uji ini dilakukan dengan prosedur (Jacob & Gerstein, 1960) dalam Bairagi *et al.*, (2002). Isolat-isolat yang diperoleh dari hasil isolasi di inokulasikan dengan cara streak pada media nutrisi agar yang diperkaya dengan skim milk (4%) Inkubasi pada 32 °C selama 15 jam. Adanya aktivitas produksi enzim proteolitik ditunjukkan oleh terbentuknya zona bening disekitar paper disk.

Hasil dan Pembahasan

Isolasi koloni bakteri dilakukan berdasarkan dominansinya. Hasil isolasi diperoleh 39 isolat yang berasal dari saluran pencernaan ikan kerapu. Ke tigapuluhsembilan isolat tersebut diberi kode A-1 sampai A-6, B-1 sampai B-13 dan I-1 sampai I-20.

Deteksi produksi senyawa antibakteri

Hasil deteksi produksi senyawa antibakteri terhadap 39 isolat yang diperoleh didapatkan 16 isolat yang menghasilkan senyawa antibakteri. Deteksi ini dilakukan berdasarkan terbentuknya zona hambat atau zona jernih disekitar koloni bakteri uji. Hasil deteksi ditunjukkan pada Tabel 3.

Berdasarkan deteksi kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri uji (Tabel 3.) diperoleh isolat yang hanya mampu menghambat pertumbuhan satu jenis bakteri uji saja adalah 9 isolat masing masing adalah isolat A-1, I-5 dan I-14 (hanya menghambat

Tabel 3. Deteksi produksi senyawa antibakteri

Kode isolate yang diuji	Produksi senyawa antibakteri				
	Bakteri uji				
	<i>V. harveyii</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. anguillarum</i>	<i>V. Alginolyticus</i>	<i>V. Vulnivicus</i>
A-1	+	-	-	-	-
A-3	-	+	-	-	-
B-2	+	+	-	-	-
B-3	-	+	+	-	-
B-5	+	+	-	-	-
B-8	-	+	-	-	-
B-9	+	-	+	-	-
B-11	-	+	-	-	-
I-1	+	-	+	-	-
I-2	-	-	-	+	-
I-3	+	+	-	-	-
I-4	-	+	-	-	-
I-5	+	-	-	-	-
I-6	-	+	-	-	-
I-14	+	-	-	-	-
I-16	-	+	+	-	-

Keterangan :

Pada uji produksi senyawa antibakteri

+ : menghambat bakteri uji

- : tidak menghambat bakteri uji

bakteri uji *V. alginolyticus*). Berdasarkan hasil pengujian juga diperoleh bahwa tidak ada satupun isolat uji yang mempunyai kemampuan untuk menghambat lebih dari 2 bakteri vibrio uji. Kemampuan menghasilkan senyawa antibakteri merupakan salah satu criteria utama dalam seleksi probiotik. Fjellheim *et al.* (2010) mendapatkan 21 isolat bakteri yang diisolasi dari larva ikan cod yang mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *V. Anguillarum*. Bjornsdottir *et al.* (2010) mendapatkan 13 isolat bakteri yang diisolasi dari *Atlantic halibut* (*Hippoglossus hippoglossus* L) yang mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Vibrio anguillarum* dan *Aeromonas salmonicida subsp. Salmonicida*. Bourouni *et al.* (2007) mendapatkan 11 isolat dari 168 isolat yang aktif terhadap *Vibrio sp.*

Deteksi produksi enzim proteolitik ekstraseluler

Kemampuan memproduksi enzim proteolitik ekstraseluler dideteksi menggunakan medium pengujian yaitu medium yang diperkaya dengan substrat enzimnya (skim milk). Pendeteksian didasarkan pada terbentuknya zona hidrolisis disekitar koloni bakteri yang diuji. Hasil uji produksi enzim proteolitik ekstraseluler menunjukkan bahwa semua isolate uji memproduksi enzim proteolitik ekstraseluler.

Pada budidaya benih ikan masalah kelulusan hidupan merupakan masalah yang sangat penting. Tingkat kelulushidupan dipengaruhi oleh banyak faktor diantaranya adalah tingkat kesehatan benih.

Aplikasi probiotik telah diakui mempunyai peranan yang nyata dalam menyehatkan hewan budidaya. Dibidang perikanan probiotik dibedakan menjadi dua yaitu *gut probiotic* dan *water probiotic*. Pada budidaya larva *gut probiotic* dipertimbangkan mempunyai peranan yang besar dalam meningkatkan kelulushidupan. Hal ini didasarkan atas kondisi *host* (benih ikan) yang masih rentan terserang penyakit infeksi, perkembangan sistem pertahanan belum berkembang dengan baik termasuk sistem pencernaan. Sistem pencernaan merupakan sistem yang terbuka yang mendapat masukan dari luar. Saluran pencernaan makanan (*gastrointestinal*) merupakan tempat utama masuknya makanan dan proses konversinya . Organ ini dikolonisasi oleh mikrobia yang berperan (berkontribusi) pada proses pencernaan makanan, fungsi imun dan

menstimulasi berbagai aktivitas *host* lainnya (Biesebeke, 2004). Oleh karena itu mikrobiota saluran pencernaan memegang peranan penting dalam menyehatkan *host*. Salah satu dasar pengendalian penyakit adalah melalui pengendalian secara hayati/biologis. Pada sistem pengendalian secara hayati ini dilakukan melalui aplikasi organisme hidup yang mempunyai kemampuan untuk menghambat pertumbuhan patogen atau parasit. Sehingga pengembangan probiotik untuk penyehatan benih ikan kerapu juga harus didasarkan pada salah satu kriteriannya adalah kemampuan menghambat pertumbuhan patogen. Antagonisme bakterial merupakan fenomena yang umum terjadi di alam, sehingga interaksi mikrobiota ini berperan penting

dalam penyeimbangan antara mikroorganisme patogenik dan mikroorganisme yang bermanfaat. Kriteria kemampuan antagonis terhadap bakteri patogen ditetapkan sebagai salah satu kriteria utama dalam seleksi probiotik (Hjelm *et al.*, 2004; Shakila *et al.*, 2006; Bouruni *et al.*, 2007; Buntin *et al.*, 2008; Prado *et al.*, 2009; Bjornsdottir, 2010; Zadeh *et al.*, 2010). Pada penelitian ini diperoleh 16 isolat yang berasal dari ikan kerapu macan yang mempunyai aktivitas antagonis yang bervariasi terhadap bakteri *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum* dan *V. vulnificus*. Perbedaan kemampuan untuk menghambat jenis-jenis bakteri patogen ini dipertimbangkan sebagai dasar pengembangan konsorsium probiotik. Pada penelitian ini (lihat Tabel 3) ditemukan ada 7 isolat yang mempunyai kemampuan menghambat 2 isolat vibrio patogen dan 9 isolat yang hanya mampu menghambat 1 jenis bakteri vibrio patogen. Diantara isolat yang menghambat 2 jenis bakteri vibrio patogen juga menunjukkan adanya variasi kombinasi jenis patogen yang dihambat, yaitu 3 isolat menghambat *V. harveyi* dan *V. parahaemolyticus*, 2 isolat menghambat *V. parahaemolyticus* dan *V. anguillarum* serta 2 isolat mampu menghambat *V. harveyi* dan *V. anguillarum*. Adanya variasi kemampuan menghambat patogen baik tunggal maupun ganda menunjukkan potensi untuk dikembangkan sebagai probiotik multispecies. Melalui aplikasi multispecies atau multistrain dengan kemampuan menghambat jenis-jenis bakteri patogen yang berbeda akan meningkatkan spektrum kemampuan probiotik untuk memproteksi *host* dari infeksi bakteri patogen. Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mendapatkan isolat-isolat bakteri yang berasal dari ekosistem laut yang mempunyai kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen, sehingga dapat dikembangkan sebagai probiotik dalam arti luas untuk mengendalikan populasi patogen (Yudiati *et al.*, 2005; 2006). Variasi kemampuan aktivitas antimikrobia terhadap bakteri patogen juga ditunjukkan oleh penelitian Shalika *et al.* (2006), Khunajakr *et al.* (2008), Musikasang, (2009), dan Prado *et al.* (2009).

Probiotik merupakan mikroorganisme hidup yang memberikan efek menguntungkan bagi kesehatan *host* pada saat dikonsumsi pada jumlah yang cukup (FAO/WHO, 2001). Jadi persyaratan suatu mikroorganisme adalah probiotik salah satunya adalah hidup. Mikroorganisme untuk hidup memerlukan nutrisi berasal dari luar sel, maka mikroorganisme dalam mencukupi kebutuhan nutrisinya secara aktif memproduksi dan mensekresikan enzim-enzim pencernaan yang berperan untuk melakukan pencernaan atau hidrolisis senyawa kompleks menjadi senyawa-senyawa sederhana yang dapat masuk ke dalam sel. Fenomena ini bersifat menguntungkan bagi

host karena aktivitas sekresi enzim pencernaan ini akan ikut berkontribusi terhadap proses pencernaan. Sehingga secara tidak langsung keberadaan bakteri probiotik dalam saluran pencernaan bermanfaat dalam meningkatkan absorpsi pakan, dan aktivitas enzim pencernaan. Peranan probiotik terhadap absorpsi pakan serta aktivitas enzim pencernaan telah direview oleh Balcazar *et al.* (2006) dan Vine *et al.* (2006). Pada penelitian ini difokuskan salah satunya pada jenis enzim proteolitik karena komponen utama pakan ikan adalah protein. Berdasarkan hasil penelitian diperoleh seluruh isolat mempunyai kemampuan menghasilkan enzim proteolitik ekstraseluler. Kemampuan bakteri probiotik untuk memproduksi enzim proteolitik ekstraseluler mempunyai peranan penting dalam ikut serta mencerna senyawa-senyawa yang bersifat protein. Hasil penelitian Geovanny & Shen (2008) menunjukkan adanya peningkatan yang nyata pada aktivitas enzim proteolitik pada udang yang diberi perlakuan probiotik dibandingkan kontrol. Penelitian yang sama mengenai pengaruh pemberian probiotik terhadap aktivitas enzim pencernaan juga dilakukan oleh Ziaei-Nejad *et al.* (2006). Zhou *et al.* (2009). Musikasang *et al.* (2009) menetapkan kemampuan untuk mencerna protein sebagai salah satu kriteria seleksi probiotik. Adanya enzim proteolitik ini selanjutnya akan meningkatkan jumlah senyawa yang bersifat protein yang dicerna sehingga menurunkan jumlah limbah yang mengandung Nitrogen yang berasal dari proses pencernaan. Hal ini menguntungkan karena akan menekan jumlah amonia yang berasal dari proses mineralisasi N-organik.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil seleksi diperoleh 8 isolat bakteri potensial untuk dapat dikembangkan sebagai materi untuk diseleksi lebih lanjut dalam rangka membentuk konsorsium probiotik. Ke 8 isolat ini mempunyai kemampuan untuk menghasilkan senyawa antibakteri yang aktif terhadap 4 jenis vibrio (*V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. harveyi*, dan *V. anguillarum*) serta menghasilkan enzim proteolitik ekstraseluler yang diperlukan untuk mencerna senyawa yang bersifat protein.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan Nasional, sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Penelitian Strategis Nasional Nomor: 513/SP2H/PP/DP2M/VII/2010, tanggal 24 Juli 2010. Ucapan terimakasih juga disampaikan kepada Balai Budidaya Air Payau (Unit Pembenuhan Ikan Kerapu dan

Laboratorium Kesehatan dan Lingkungan) Situbondo yang telah ikut berkontribusi menyediakan materi penelitian dan fasilitas laboratorium guna penanaman dan isolasi bakteri.

Daftar Pustaka

- Afero, F., Miao, S., & Perez, A.A., 2009. Economic analysis of tiger grouper *Epinephelus fuscoguttatus* and humpback grouper *Cromileptes altivelis* commercial cage culture in Indonesia. *Aquacult Int*, DOI 10.1007/s10499-009-9295-x.
- Bairagi, A., K. Ghosh, S. Kumarsen, & A. K. Ray, 2002. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. *Aquaculture International* 10: 109–121.
- Balcazar, J. L. & T. R. Luna, 2007. Inhibitory Activity of Probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 Against *Vibrio* Species Confers Protection Against Vibriosis in Juvenile Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Curr Microbiol*, 55: 409–412.
- Balcazar, J. L., I. deBlas, I. Ruiz-Zarzuola, D. Cunningham, D. Vendrell, & J. L. Muñiz, 2006. The role of probiotics in aquaculture: Review. *Veterinary Microbiology* 114: 173–186.
- Balcázar, J. L., T. R. Luna, & D. P. Cunningham, 2007, Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 96: 2147-150.
- Biesebeke, R.T., Boesten R., E.S. Klaassen, CCGM. Boonjink, MC. De Vries, M. Derrien, DPA. Cohen, F. Schuren, E.E. Vaughan, M. Kleerebeshem, & WM de Fos, 2004. Microbial functionality in human gastrointestinal tract. *Microbes Environment*. 19: 276-289
- Bjornsdottir, R., E. G. Karadottir, J. Johannsdottir, E. E. Thorarinsdottir, H. Smaradottir, S. Sigurgjladottir & B. K. Gudmundsdottir, 2010. Selection of bacteria and the effects of bacterial treatment of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) eggs and larvae. *Aquaculture* 302: 219-227.
- Bouruni, O.C., M. El Bour, R. Mrauna, H. Abdennaceur, & A. Boudabous, 2007. Preliminary selection study of potential probiotic bacteria from aquacultural area in Tunisia. *Annals of Microbiology*, 57 : 185-190.
- Brunt J., & B Austin, 2005. Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Diseases* 2005: 693–701.
- Buntin, N., S. Chanthachumand, & T. Hongpattarakere, 2008. Screening of lactic acid bacteria from gastrointestinal tracts of marine fish for their potential use as probiotics. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 30 (Suppl.1) : 141-148
- FAO/WHO, 2001. Health and Nutritional Properties of Probiotics info od including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, Córdoba, Argentina, 34 pp.
- Geovanny, D. G. R., & M.A .Shen, 2008. Influence of Probiotics on the Growth and Digestive Enzyme Activity of White Pacific Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *J. Ocean Univ. Chin.* 7: 215-218.
- Ghosh, S., S. K. Sen & A. K. Ray, 2002. Enzyme Producing Bacterial Flora Isolated from Fish Digestive Tracts. *Aquaculture International* 10: 109–121.
- Gómez R. Geovanny, Balcázar José Luis, & MA Shen, 2007. Probiotics Control Agents in Aquaculture. *J. Ocean University of China.* 6: 76-79.
- Gómez R. Geovanny D. & MA Shen, 2008, Influence of Probiotics on the Growth and Digestive Enzyme Activity of White Pacific Shrimp (*Litopenaeus vannamei*), *J. Ocean Univ. Chin. (Oceanic and Coastal Sea Research)*, 7: 215-218.
- Fjellheim, A. J., G. Klinkenberg, J. Skjermo, I. M. Aasen, & O. Vadstein, 2010. Selection of candidate probiotics by two different screening strategies from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Veterinary Microbiology* 144: 153–159.
- Hjelm, M., Ø. Bergh, A. Riaza, J. Nielsen, J. Melchiorson, S. Jensen, H. Duncan, P. Ahrens, H. Birkbeck, & L. Gram, 2004. Selection and Identification of Autochthonous Potential Probiotic Bacteria from Turbot Larvae (*Scophthalmus maximus*) Rearing Units System. *Appl. Microbiol.* 27: 360–371.
- Ishihata, S. T. Inagaki, S. Okunishi, M. Nakano, R. Tanaka, & H. Maeda, 200., Colonization and probiotic effects of Lactic acid bacteria in the gut of the abalone *Haliotis gigantean*. *Fish. Sci.* 75: 1285-1293.

- Kanmani P, R.S. Kumar, N. Yuvaraj, K.A. Paari, V. Pattukumar, & V. Arul, 2010. Comparison of antimicrobial activity of probiotic bacterium *Streptococcus phocae* P 180, *Enterococcus faecium* MC 13 and *Carnobacterium divergens* against fish pathogen. *World J. Dairy & Food Sci.*, 5: 145-151
- Khunajakr, N., A. Wongwicharn, D. Moonmangmee, & Sukon Tantipaiboonvut, 2008. Screening and Identification of lactic Acid Bacteria Producing Antimicrobial Compounds From Pig Gastrointestinal Tract. *KMITL Sci. Tech. J.* 1 :8-17.
- Li, K., T.Zheng, Y. Tian, F. Xi, J. Yuan, G. Zhang, & H. Hong, 2007. Beneficial effects of *Bacillus licheniformis* on the intestinal microflora and immunity of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, *Biotechnol Lett*, 29: 525-530.
- Lin, H. Z., Z. Guo, Y. Yang, W. Zheng & Z. J Li, 2004. Effect of dietary probiotics on apparent digestibility coefficients of nutrients of white shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone. *Aquaculture Research*, 35 : 1441-1447.
- Luo, Z., Y.J. Liu, K.S. Mai, L.X. Tian, D.H. Liu, X.Y. Tan, & H.Z. Lin., 2005. Effect of dietary lipid level on growth performance, feed utilization and body composition of grouper *Epinephelus coioides* juveniles fed isonitrogenous diets in floating netcages. *Aquaculture International* 13: 257-269.
- Metges. C.C, 2000. Contribution of Microbial Amino Acids to Amino Acid Homeostasis of the Host. *J. Nutrition*, 130:1857S-1864S.
- Moussavi, M., & C. Adams, 2009, An In Vitro Study on Bacterial Growth Interactions and Intestinal Epithelial Cell Adhesion Characteristics of Probiotic Combinations *Curr. Microbiol.* DOI10.1007/s00284-009-9545-1.
- Musikasang, H., A.Tani, A.H-kittikun, & S.Maneerat, 2009. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from chicken Gastrointestinal digestive tract. *World J. Microbiol. Biotechnol* 25: 1337-1345.
- Panigrahi, A., V.Kiron, S.Satoh, & T.Watanabe, 2009. Probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* influences the blood profile in rainbowtrout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Fish Physiol Biochem*, DOI10.1007/s10695-009-9375-x.
- Prado, S., J. Montes, J. L. Romalde, & J. L. Barja, 2009. Inhibitory activity of *Phaeobacter* strains against aquaculture pathogenic bacteria. *International Microbiology* 12:107-114.
- Ravi A.V.,K.S. Musthafa,G. Jegathammbal. Kathiresan, & S.K. Pandian, 2007. Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic Vibrios in marine aquaculture. *Letters in Applied Microbiology* 45: 219-223.
- Sequeiro, C., M. Vallejo, E. R. Marguet, & N.L.Olivera, 2010. Inhibitory activity against the fish pathogen *Lactococcus garvieae* produced by *Lactococcus lactis* TW34, a lactic acid bacterium isolated from the intestinal tract of a Patagonian. *Arch Microbiol*, 192: 237-245.
- Shalika, R.J., R. Saravanakumar, S.A.P. Vyla, G. Jeyasekaran, & G.I. Jasmine, 2006. Antagonistic Activity of the Gut Microflora Isolated from Farmed Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*). *Asian Fisheries Science*, 19: 247-255.
- Swaim S. M., C. Singh, & V. Arul, 2009. Inhibitory activity of probiotics *Streptococcus phocae* P180 and *Enterococcus faecium* MC13 against Vibriosis in shrimp *Penaeus monodon*. *World J Microbiol Biotechnol.* 25: 697-703.
- Vaseeharan B. & P. Ramasamy, 2003. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Letters in Applied Microbiology*, 36: 83-87.
- Vine N.G., L. W.D. Eukes, & Kaiser H., 2006. Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiol Rev.* 30: 404-27.
- Yoshii, K, F. Takakuwa, H. P. Nguyen, T. Masumoto, & H. Fukada, 2010. Effect of dietary lipid level on growth performance and feed utilization of juvenile kelp grouper *Epinephelus bruneus*. *Fish. Sci.*, 76: 139-145.
- Yudiati, E., Subagiyo, W.A. Setyati, A. Isnansetyo, & J. Widada, 2005. Eksplorasi dan Aplikasi Marine Bacteria Antagonis terhadap Bakteri Patogen Dalam Upaya Pengendalian Penyakit Ikan dan Udang Secara Terpadu, Laporan penelitian Hibah Pekerti Tahun I, Lembaga Penelitian. Universitas Diponegoro.
- Yudiati, E., Subagiyo, W.A. Setyati, A. Isnansetyo, & J. Widada, 2006. Eksplorasi dan Aplikasi Marine

- Bacteria Antagonis terhadap Bakteri Patogen Dalam Upaya Pengendalian Penyakit Ikan dan Udang Secara Terpadu, Laporan penelitian Hibah Pekerti Tahun I, Lembaga Penelitian. Universitas Diponegoro.
- Yudiati, E., Subagyo, W.A. Setyati, A. Isnansetyo, & J. Widada, 2006. Eksplorasi dan Aplikasi Marine Bacteria Antagonis terhadap Bakteri Patogen Dalam Upaya Pengendalian Penyakit Ikan dan Udang Secara Terpadu, Laporan penelitian Hibah Pekerti Tahun II, Lembaga Penelitian Universitas Diponegoro.
- Zadeh, S. S., C. R. Saad, A. Christianus, M. S. Kamarudin, K. Sijam, M. N. Shamsudin, & V. K. Neela, 2010. Assessment of growth condition for a candidate probiotic, *Shewanella algae*, isolated from digestive system of a healthy juvenile *Penaeus monodon*. *Aquacult. Int.* DOI10.1007/s10499-010-9319-6.
- Zhao, R., J. Sun, H. Mo., & Y. Zhu, 2007. Analysis of functional properties of *Lactobacillus acidophilus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 23:195-200.
- Zhou.X., Y. Wang, & W. Li, 2009 . Effect of Probiotic on Larvae Shrimp (*Penaeus vannamei*) Based on Water Quality, Survival Rate and Digestive Enzyme Activities. *Aquaculture* 287 : 349–353.
- Ziaei-Nejad S., M. H. Rezaei, G. A. Takami, D. L. Lovett, A.R. Mirvaghefi, & M. Shakouri, 2006. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture*, 252 : 516-524.