

Properti Probiotik Isolat Bakteri Asam Laktat untuk Mengendalikan Pertumbuhan *Vibrio alginolyticus* pada Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*)

Nursyirwani^{1*}, W. Asmara², A.E.T.H. Wahyuni² dan Triyanto³

¹Jurusan Ilmu Kelautan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Riau Kampus Bina Widya Sp.Panam Pekanbaru-Riau-Indonesia. Telp.0761-862620 E-mail: nursyirwani_adnan@yahoo.com

²Program Studi Sain Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gajah Mada, Yogyakarta

³Jurusan Perikanan Fakultas Pertanian, Universitas Gajah Mada, Yogyakarta

Abstrak

Tujuan penelitian ini adalah untuk menyeleksi isolat bakteri asam laktat (BAL) yang telah diisolasi dari ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) berdasarkan toleransi terhadap pH dan bile salts, patogenisitas dan kemampuannya menekan pertumbuhan *Vibrio alginolyticus* pada uji ko-kultur. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dua puluh isolat BAL yang telah diuji antagonismenya terhadap *V. alginolyticus* pada penelitian terdahulu, dapat hidup pada pH rendah 3 dan tumbuh pada konsentrasi bile salts 0,5% kecuali isolat KSBU 13D. Semua isolat tidak patogen terhadap ikan Kerapu Macan setelah diinfeksi BAL pada konsentrasi 10^7 cfu/ml secara intraperitoneal (IP). Pada uji ko-kultur, dari 6 isolat BAL yang dipilih, tiga isolat (KSBU 12C, KSBU 5Da, KSBU 9) berturut-turut mampu menekan pertumbuhan *V. alginolyticus*, dan penambahan konsentrasi BAL terbaik adalah 10^7 cfu/ml.

Kata kunci: bakteri asam laktat, vibriosis, patogenisitas, ko-kultur, kerapu macan

Abstract

The research objective was to select lactic acid bacteria which previously isolated from Tiger Grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) based on pH and bile salts tolerances, pathogenicity test and ability to decrease the growth of *Vibrio alginolyticus* in co-culture test. The result shows that twenty isolates which had also been examined their antagonisms against *V. alginolyticus* previously, were able to survive relatively low pH values 3 and able to survive at high bile salts concentrations 0.5% except KSBU 13D isolate. All isolates were non-pathogenic to Tiger Grouper after being intraperitoneally infected with the lactic acid bacteria at concentration 10^7 cfu/ml. In co-culture test, *V. alginolyticus* was reduced significantly by three isolates (KSBU 12C, KSBU 5Da, KSBU 9) from 6 isolates selected, and the best additional bacterial concentration was 10^7 cfu/ml.

Key words: lactic acid bacteria, vibriosis, pathogenicity, kerapu macan

Pendahuluan

Ikan Kerapu, *Epinephelus* spp., adalah salah satu spesies ikan budidaya laut yang paling penting di negara-negara China dan Asia Tenggara karena karakteristik biologinya yang sangat baik, seperti pertumbuhannya cepat, rasanya terkenal enak dan nilai ekonomi yang tinggi (Pierre *et al.*, 2008). Namun, salah satu kendala yang sering dihadapi dalam budidaya ikan Kerapu adalah serangan penyakit. Penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Vibrio* (vibriosis) telah banyak dilaporkan. *Vibrio alginolyticus* merupakan pathogen utama yang menginfeksi ikan Kerapu, *Epinephelus coioides* (Huang, 2005), Kerapu

Tikus, *Cromileptes altivelis* (Nitimulyo *et al.*, 2005) dan Kerapu Macan, *Epinephelus fuscoguttatus* (Desrina *et al.*, 2006). Karena tingginya mortalitas dan kejadian penyakit bakteri dalam budidaya ikan, antibiotik sering digunakan dalam jumlah besar untuk pencegahan dan kontrol penyakit. Tetapi, penggunaan antibiotik dapat mengganggu mikrobiota usus dan memicu populasi bakteri yang resisten, dengan efek jangka panjang pada kesehatan masyarakat. Karena itu, penggunaan probiotik telah disarankan sebagai metode alternatif untuk mencegah dan mengontrol berbagai penyakit dalam akuakultur (Wang *et al.*, 2008; Nayak, 2010).

Probiotik telah digunakan dalam akuakultur

untuk mengontrol penyakit, sebagai suplementasi atau bahkan dalam mengganti penggunaan senyawa-senyawa antimikrobia. Probiotik yang telah diterapkan pada ikan dan *shellfish* adalah mikroalga (*Tetraselmis*), yeasts (*Debaryomyces*, *Phaffia*, and *Saccharomyces*), dan bakteri Gram-positif (*Bacillus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, and *Weissella*) dan bakteri Gram-negatif (*Aeromonas*, *Alteromonas*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*, and *Vibrio*) (Chiu *et al.*, 2007). Pemberian pakan probiotik *Bacillus pumilus* dapat memperbaiki efisiensi pakan, sementara pemberian *B. clausii* dapat memperbaiki efisiensi pakan dan laju pertumbuhan, dan kedua strain dapat menginduksi regulasi respon imun seluler dan humoral pada ikan Kerapu, *E. coioides* (Sun *et al.*, 2010).

Bakteri asam laktat (BAL) telah digunakan secara luas dan diteliti sebagai probiotik untuk manusia, hewan ternak daratan dan akuatik. Hal ini berdasarkan pada kenyataan bahwa BAL adalah penghuni alami saluran pencernaan manusia dengan kemampuan toleransi terhadap lingkungan asam dan empedu (*bile*) dari saluran pencernaan. Bakteri asam laktat juga berfungsi untuk mengubah laktosa menjadi asam asetat, sehingga menurunkan pH saluran pencernaan dan secara alami mencegah kolonisasi banyak bakteri (Watson *et al.*, 2008).

Bakteri asam laktat telah digunakan sebagai probiotik dan immunostimulan, selain untuk usaha perbaikan kualitas air dan nutrisi, juga untuk meningkatkan kelulushidupan larva dan produk akuakultur (Panigrahi *et al.*, 2005). Ekstrak bebas sel dari empat strain bakteri asam laktat (*L. acidophilus*, *Streptococcus cremoris*, *L. bulgaricus*-56 dan *L. bulgaricus*-57) menekan pertumbuhan *V. alginolyticus* secara *in vitro* dan secara *in vivo* pada udang *Penaeus indicus* (Ajitha *et al.*, 2004). Bakteri asam laktat dari strain B6 aman digunakan sebagai probiotik pada udang *Litopenaeus vannamei* dan untuk mencegah infeksi *Vibrio* ssp. (Vieira *et al.*, 2007). Pemberian pakan probiotik *Lactobacillus plantarum*, meningkatkan pertumbuhan, respon imun alami, dan resistensi terhadap *Streptococcus* sp. dan iridovirus pada ikan Kerapu, *Epinephelus coioides* (Son *et al.*, 2009).

Seleksi probiotik sangat penting karena mikroorganisme yang tidak tepat dapat menimbulkan efek yang tidak diinginkan pada inang (Sun *et al.*, 2010). Untuk menyeleksi probiotik secara umum adalah melakukan uji antagonisme secara *in vitro*. Selain itu, probiotik harus mampu hidup pada saluran pencernaan inang (resisten terhadap *bile salts*, pH

rendah dan protease) dan mampu berkolonisasi pada sel epitel intestin untuk mengurangi dan mencegah kolonisasi patogen. Probiotik yang digunakan sebaiknya adalah strain yang berasal dari inangnya, bersifat nonpatogen dan memberikan efek yang menguntungkan bagi inang (memperbaiki nutrisi dan meningkatkan respon imun), dan probiotik mesti hidup dan tahan pada kondisi penyimpanan dan dapat diproses pada skala industri seperti dengan cara liopilisasi (Vine *et al.*, 2004; Balcazar *et al.*, 2006).

Meskipun sudah banyak penelitian tentang keberadaan BAL pada saluran pencernaan ikan dan lingkungan perairan, serta kemampuannya sebagai probiotik, namun pada ikan Kerapu Macan masih belum banyak yang diteliti. Bakteri asam laktat telah berhasil diisolasi dari saluran pencernaan ikan Kerapu Macan dari perairan laut Situbondo, Jawa Timur. Dari uji antagonisme terhadap bakteri patogen *V. alginolyticus* secara *in vitro*, didapatkan 20 isolat yang potensial. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan uji lanjutan terhadap toleransi isolat-isolat tersebut pada pH dan *bile salts* (garam empedu), patogenisitas pada ikan Kerapu Macan dan kemampuannya menekan pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus*.

Materi dan Metode

Materi penelitian

Isolat BAL yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri yang diisolasi dari saluran pencernaan ikan Kerapu Macan dari perairan laut Situbondo, Jawa Timur. Sebanyak 20 isolat yang didapat telah diuji antagonisme terhadap *V. alginolyticus* isolat dari Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau (BBPAP) Jepara, Jawa Tengah. Isolat BAL dan potensi antivibrionya (Nursyirwani *et al.*, 2011). Penelitian ini dilakukan dari bulan Januari sampai dengan bulan Juni 2011. Uji toleransi terhadap pH, bile salt dan ko-kultur dilakukan di Laboratorium Hama dan Penyakit Ikan Jurusan Perikanan Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Sedangkan uji patogenisitas dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Balai Budidaya Air Payau (BBAP) Situbondo, Jawa Timur.

Toleransi terhadap pH

Uji ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat BAL untuk tumbuh pada pH 3, 4, 5 dan 6. Prosedur pengamatan dilakukan menurut Hardiningsih *et al.* (2006). Isolat BAL diinokulasi pada medium cair de Mann, Rogosa, Sharpe (MRS *broth*, Merck, Darmstadt, Germany) yang telah diatur pH nya

sesuai dengan pH uji dengan penambahan HCl 1% atau NaOH 1%. Setelah diinkubasi selama 48 jam dilakukan pengukuran OD (*Optical Density*) dengan Spektrofotometer (APEL AP-101 Photoelectronic Colorimeter, Japan) pada panjang gelombang 600 nm. Sebagai kontrol dan blanko digunakan MRS broth tanpa inokulasi bakteri. Setiap perlakuan diulang sebanyak dua kali.

Toleransi terhadap bile salt

Uji ini dilakukan untuk mengamati kemampuan isolat BAL untuk tumbuh pada berbagai konsentrasi garam empedu (*bile salt*). Pengamatan dilakukan menurut prosedur yang dilakukan Buntin *et al.* (2008). Isolat BAL digoreskan pada medium agar MRS, masing-masing ditambahkan dengan *bile salt* (Oxoid) pada konsentrasi 0,2, 0,3, 0,4 dan 0,5%.

Uji patogenesis

Uji ini bertujuan untuk mengetahui apakah isolat bakteri asam laktat (BAL) yang telah diisolasi dari usus ikan Kerapu Macan bersifat patogen atau tidak. Ikan Kerapu Macan yang digunakan berukuran 10–12 cm sebanyak 250 ekor, terlebih dahulu diadaptasikan dalam bak penampungan selama 3 hari dan diberi pakan pelet sebanyak 3% dari berat ikan dengan frekuensi pemberian pakan 3-4 kali per hari. Ikan dipindahkan ke dalam 21 buah akuarium yang berukuran 60x40x40 cm³ sebanyak 10 ekor ikan per akuarium (untuk 20 isolat BAL dan 1 kontrol).

Penelitian ini dilakukan menurut prosedur Aly *et al.* (2008a). Isolat BAL ditumbuhkan pada media MRS broth pada suhu 30°C, setelah 48 jam sel bakteri dipanen dengan disentrifugasi pada kecepatan 3500 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Pelet dicuci dua kali dengan larutan PBS (pH 7,4), disentrifugasi seperti sebelumnya. Bakteri disuspensikan dalam larutan PBS dengan menggunakan standar McFarlan ekuivalen dengan kepadatan bakteri 10⁷ sel/ml. Kemudian ikan dari tiap kelompok diinjeksi dengan suspensi tiap-tiap isolat BAL 10⁷ cfu/ml secara injeksi peritoneal (IP). Sebagai kontrol, ikan disuntikkan dengan PBS sebanyak 0,1 ml/ikan. Selama masa pengujian, air akuarium diganti sebanyak 50% dan diaerasi, dan ikan diberi makan pelet sebanyak 3% dari berat ikan dengan frekuensi pemberian pakan 3-4 kali per hari. Ikan dipelihara dan diamati selama 7 hari. Pengamatan dilakukan terhadap gejala klinis, kualitas air dan mortalitas. Pengamatan gejala klinis meliputi gerakan ikan, reaksi terhadap rangsangan, nafsu makan, pernafasan, posisi ikan dalam akuarium, perubahan warna, jumlah lendir, adanya gripsis dan lesi eksternal lainnya.

Uji Ko-kultur

Uji ini dilakukan untuk mengamati kemampuan enam isolat BAL (KSBU 5Aa, KSBU 5Da, KSBU 9, KSBU 11B, KSBU 12B dan KSBU 12C) dalam menghambat pertumbuhan *V. alginolyticus*. Isolat-isolat tersebut dipilih berdasarkan zona hambat terluas pada uji antibakteri, toleransi terhadap pH dan *bile salts*. Uji ini dilakukan menurut prosedur Vaseeharan & Ramasamy (2003). Isolat BAL dan *V. alginolyticus* sebelumnya dikultur secara terpisah di dalam media *Trypticase soya broth* (TSB, Oxoid). *V. alginolyticus* diinokulasi ke dalam TSB dengan konsentrasi 10³ cfu/ml per tabung reaksi, kemudian tiap tabung ditambahkan dengan isolat BAL dengan konsentrasi 0 (kontrol), 10³, 10⁵ dan 10⁷ cfu/ml. Perlakuan ini dilakukan dengan dua kali ulangan. Semua tabung ko-kultur tersebut diinkubasi pada suhu 30°C dan pertumbuhan koloni *V. alginolyticus* diamati setiap hari selama 5 hari. Jumlah *V. alginolyticus* dihitung dengan menyiapkan serial pengenceran 10⁻¹-10⁻⁷, dan sebanyak 0,1 ml dari tiap pengenceran diinokulasi pada agar *Thiosulphate citrate bile salts sucrose* (TCBS, Merck), kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 24-48 jam.

Hasil dan Pembahasan

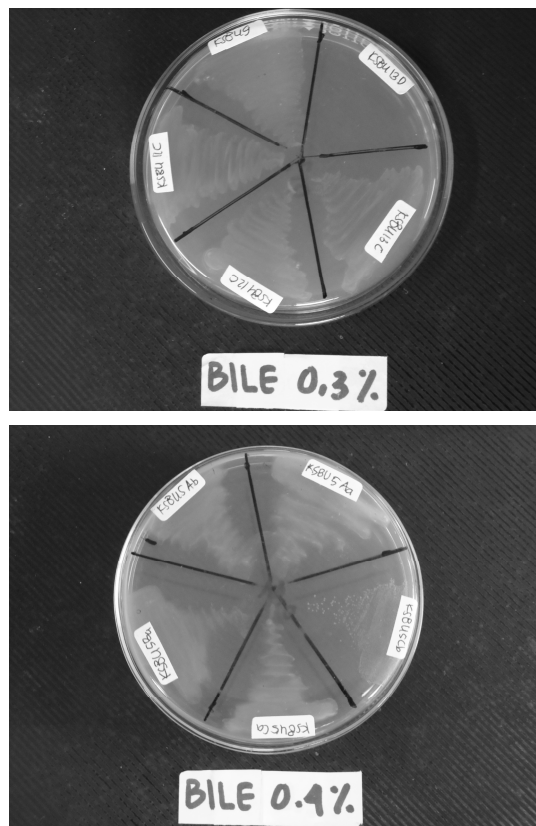
Toleransi isolat BAL terhadap pH dan bile salts

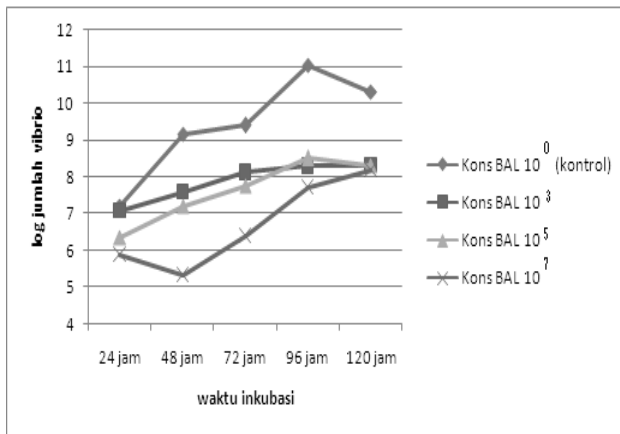
Bakteri asam laktat yang diisolasi dari ikan Kerapu Macan bersifat resisten dan dapat hidup pada kondisi pH rendah. Dari hasil pengukuran kerapatan optik (OD) dari kultur cair isolat BAL dengan pH 3, 4, 5 dan 6 (Tabel 1), nilai OD tertinggi berturut-turut didapatkan dari isolat KSBU 14B, KSBU 13C, KSBU 14B dan KSBU 12B. Hasil penelitian ini menunjukkan hasil yang sama dengan hasil yang didapatkan oleh Balcazar *et al.* (2008) dimana BAL strain *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum* dan *L. fermentum* dapat hidup pada kisaran pH 2,5 sampai 6,5.

Toleransi terhadap empedu ikan (*fish bile*) adalah penting bagi strain probiotik untuk tumbuh dan hidup pada usus ikan. Dari hasil penelitian ini didapatkan 19 isolat BAL (95%) dapat tumbuh pada medium agar MRS dengan konsentrasi *bile salts* 0,2% sampai 0,5% (Gambar 1). Hasil ini lebih baik dari hasil yang didapat oleh Buntin *et al.* (2008) dari 160 isolat yang diuji, berturut-turut hanya 43,12%, 20,00% dan 11,85% isolat yang dapat tumbuh pada *bile salts* 2000, 3000 dan 4000 ppm. Sedangkan hasil penelitian Balcazar *et al.*, (2008) menunjukkan hasil tidak ada perbedaan jumlah yang signifikan antara strain BAL yang diuji pada PBS yang mengandung konsentrasi *fish bile* 2,5 sampai 10%.

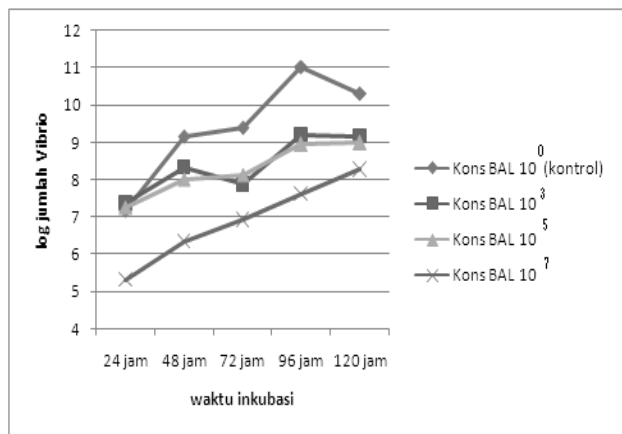
Tabel 1. Nilai OD ($\lambda = 600$ nm) rata-rata dari kultur cair isolat BAL pada kisaran pH berbeda

No.	Isolat	pH			
		3	4	5	6
1.	KSB4B	0.074±0.000	0.008±0.002	0.160±0.007	0.322±0.001
2.	KSB5Aa	0.037±0.001	0.035±0.003	0.047±0.001	0.324±0.003
3.	KSB5Ab	0.038±0.004	0.017±0.010	0.039±0.004	0.314±0.001
4.	KSB5Ba	0.125±0.002	0.037±0.003	0.134±0.002	0.049±0.005
5.	KSB5Ca	0.025±0.001	0.022±0.005	0.070±0.008	0.333±0.001
6.	KSB5Cb	0.139±0.003	0.032±0.002	0.127±0.003	0.027±0.003
7.	KSB5Da	0.127±0.001	0.042±0.001	0.106±0.003	0.015±0.001
8.	KSB5Db	0.076±0.008	0.008±0.000	0.126±0.004	0.326±0.003
9.	KSB 9	0.107±0.005	0.010±0.004	0.157±0.005	0.330±0.001
10.	KSB11A	0.081±0.000	0.006±0.002	0.206±0.004	0.348±0.025
11.	KSB11B	0.085±0.002	0.012±0.002	0.125±0.007	0.018±0.004
12.	KSB11C	0.127±0.004	0.026±0.002	0.158±0.003	0.013±0.004
13.	KSB12A	0.122±0.016	0.009±0.001	0.171±0.001	0.324±0.003
14.	KSB12B	0.035±0.004	0.008±0.001	0.138±0.009	0.366±0.031
15.	KSB12C	0.082±0.003	0.049±0.001	0.137±0.009	0.013±0.003
16.	KSB13B	0.037±0.000	0.012±0.001	0.141±0.001	0.005±0.006
17.	KSB13C	0.076±0.010	0.050±0.004	0.074±0.001	0.013±0.001
18.	KSB13D	0.130±0.006	0.020±0.003	0.170±0.010	0.014±0.002
19.	KSB14A	0.143±0.004	0.012±0.001	0.168±0.006	0.019±0.001
20.	KSB14B	0.157±0.000	0.039±0.003	0.223±0.009	0.023±0.007
21.	Kontrol	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000

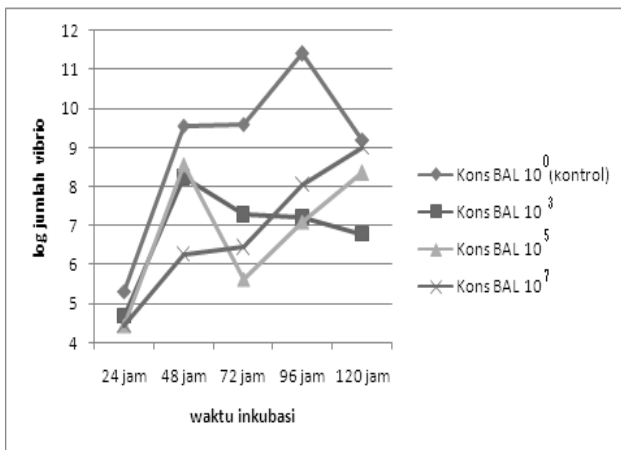
**Gambar 1.** Pertumbuhan isolat BAL pada konsentrasi *bile salts* berbeda. Isolat KSB 13D tidak tumbuh pada semua konsentrasi *bile salts* yang diuji.



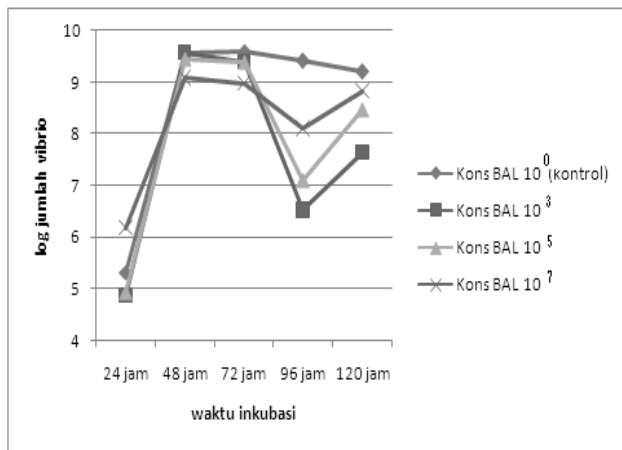
a. Isolat KSBu 5Da



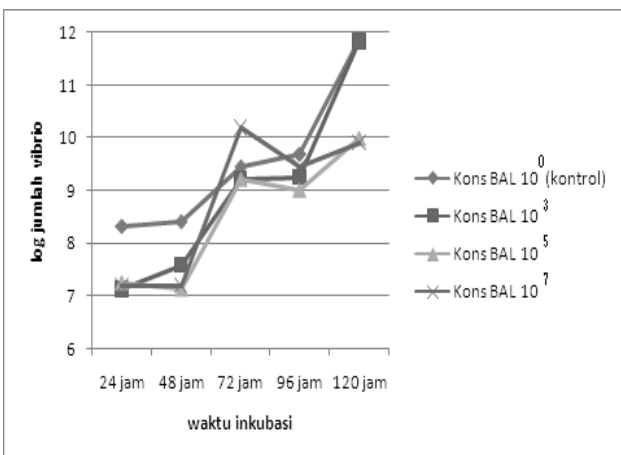
b. isolat KSBu 12C



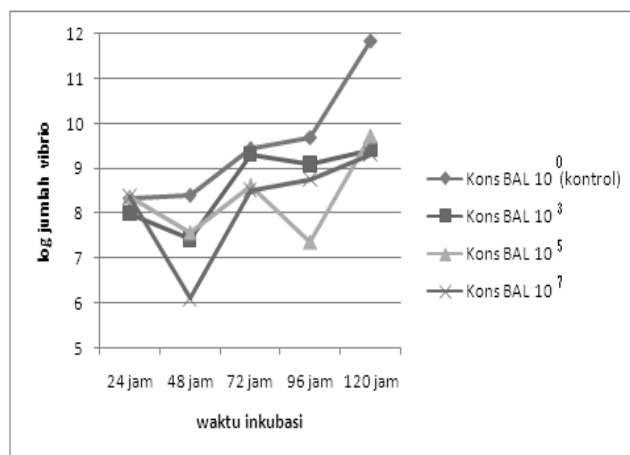
c. isolat KSBu 11B



d. isolat KSBu 5Aa



e. isolat KSBu 12B



f. isolat KSBu 9

Gambar 2. Perkembangan logaritma jumlah *V. alginolyticus* (inokulasi awal 10³ cfu/ml) pada uji ko-kultur dengan konsentrasi awal BAL 10³, 10⁵ dan 10⁷ cfu/ml selama 120 jam.

Patogenitas isolat BAL terhadap ikan

Salah satu kriteria penting untuk pemilihan calon probiotik adalah bahwa organisme tersebut harus bersifat nonpatogenik terhadap inang. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa semua isolat BAL dengan konsentrasi masing-masing 10^7 sel/ml yang diinfeksi tidak menimbulkan infeksi dan penyakit pada ikan Kerapu Macan dengan tingkat sintasan (*survival rate*) 100%. Selama tujuh hari pengamatan, ikan menunjukkan pergerakan aktif, nafsu makan tinggi dan cenderung bergerombol di dasar bak pemeliharaan. Hasil yang sama juga didapatkan dari hasil penelitian Aly *et al.* (2008b), yaitu *Bacillus subtilis* dan *Lactobacillus acidophilus* yang diinjeksi intraperitoneal (IP) tidak berbahaya dan tidak menimbulkan kematian pada ikan Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) selama 15 hari pengamatan. Sementara itu, Vieira *et al.* (2007) mendapatkan strain B6 dari 14 strain bakteri asam laktat yang diisolasi dari saluran pencernaan udang, dan ditambahkan ke dalam air media pemeliharaan larva udang *Litopenaeus vannamei*. Tingkat sintasan yang diperoleh adalah 79,8% setelah ditantang dengan *Vibrio harveyi* dan 73,3% tanpa *V. harveyi*.

Kemampuan isolat BAL menghambat pertumbuhan *V. alginolyticus*

Setiap isolat BAL yang diuji menunjukkan kemampuan yang berbeda dalam menghambat pertumbuhan *V. alginolyticus* pada inokulasi awal 10^3 cfu/ml (Gambar 2). Penghambatan pertumbuhan yang terbaik ditunjukkan oleh isolat KSBU 12C, diikuti oleh isolat KSBU 5Da. Meskipun jumlah *V. alginolyticus* terus meningkat sampai waktu pengamatan 120 jam, jika dibandingkan dengan kontrol, penambahan BAL pada konsentrasi awal 10^3 , 10^5 dan 10^7 cfu/ml dapat menekan pertumbuhan bakteri patogen tersebut. Demikian pula dengan penambahan isolat KSBU 9 pada konsentrasi berbeda juga menunjukkan penurunan jumlah *V. alginolyticus*, namun tidak terlihat perbedaan antara perlakuan ketiga konsentrasi bakteri pada akhir pengamatan. Sementara pada isolat KSBU 11B, meskipun jumlah *V. alginolyticus* pada kontrol tetap tertinggi, namun tidak terlihat perbedaan antara ketiga perlakuan konsentrasi bakteri. Sedangkan pada perlakuan dengan isolat KSBU 5Aa dan KSBU 12B hampir tidak ada perbedaan antara kontrol dan perlakuan konsentrasi berbeda.

Hjelm *et al.* (2004) mendapatkan pengurangan jumlah *V. anguillarum* 90-11-287 dan *V. splendidus* (konsentrasi awal 10^2 – 10^3 cfu/ml) setelah penambahan *Roseobacter* 27-4 (konsentrasi awal 10^6 – 10^7 cfu/ml), pada hari pertama

pengurangan terjadi sebanyak 1-2 unit logaritma, kemudian empat hari berikutnya terjadi pengurangan 10^2 – 10^3 cfu/ml. Demikian pula, Hai *et al.* (2007) mendapatkan densitas sel *Vibrio* spp. tidak pernah melebihi level inokulasinya (10^3 cfu/ml) dengan penambahan probiotik B (*Pseudomonas synxantha*) dan probiotik C (*P. aeruginosa*) pada inokulasi awal 10^3 , 10^5 dan 10^7 cfu/ml, densitas sel kedua probiotik tersebut meningkat signifikan pada masa inkubasi 24, 48 dan 72 jam. Dari hasil penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa jumlah patogen dapat dikontrol secara *in vitro* apabila konsentrasi probiotik meningkat.

Kesimpulan

Berdasarkan uji toleransi terhadap pH semua (20) isolat bakteri asam laktat resisten dan dapat tumbuh pada pH 3 sedangkan pada uji toleransi terhadap *bile salts* 0,5% hanya satu isolat (KSBU 13D) yang tidak tumbuh. Pada uji patogenitas semua isolat BAL tidak bersifat patogen pada ikan Kerapu Macan. Dari uji ko-kultur, tiga isolat (KSBU 12C, KSBU 5Da dan KSBU 9) mampu menekan pertumbuhan *V. alginolyticus*. Oleh karena itu, perlu dilakukan uji adhesi *in vitro* untuk mengetahui kemampuan kolonisasi isolat BAL pada usus ikan, dan uji tantang isolat BAL terhadap *V. alginolyticus* pada ikan Kerapu Macan.

Ucapan Terima Kasih

Terimakasih kepada Kepala BBAP Situbondo dan Kepala Laboratorium Hama dan Penyakit Ikan Jurusan Perikanan Fakultas Pertanian UGM yang telah mengizinkan penggunaan fasilitas laboratorium, dan Nusy Fitriaweilni Dewi yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini dengan baik.

Daftar Pustaka

- Ajitha, S., M. Sridhar, N. Sridhar, I.S.B. Singh & V. Varghese. 2004. Probiotic effects of lactic acid bacteria against *Vibrio alginolyticus* in *Penaeus* (*Fenneropenaeus*) *indicus* (H. Milne Edwards). *Asian Fish. Sci.*, 17: 71-80.
- Aly, S.M., A.M. Abd-El-Rahman, G. John & M.F. Mohamed. 2008a. Characterization of Some Bacteria Isolated from *Oreochromis niloticus* and their Potential Use as Probiotics. *Aquaculture*, 277: 1–6.
- Aly, S.M., Y.A.G. Ahmed, A.A.A. Ghareeb & M.F. Mohamed. 2008b. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential

- probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish & Shellfish Immunology*, 25: 128-136.
- Balcazar, J.L., I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, D. Cunningham, D. Vendrell, & J.L. Mu'zquiz. 2006. The role of probiotics in aquaculture. Review. *Veterinary Microbiology*, 114: 173-186.
- Balcazar, J.L., D. Vendrell, I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, J.L. Muzquiz & O. Girones. 2008. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. Short communication. *Aquaculture*, 278: 188-191.
- Buntin, N., S. Chanthachum, & 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.
- Chiu, C.H., Y.K. Guu, C.H. Liu, T.M. Pan & W. Cheng. 2007. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. *Fish & Shellfish Immunology*, 23: 364-377.
- Desrina, A. Taslihan, Ambariyanto & S. Suryaningrum. 2006. Uji keganasan bakteri *Vibrio* pada ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*). *Ilmu Kelautan*, 11(3): 119-125.
- Hai, N.V., R. Fotedar & N. Buller. 2007. Selection of probiotics by various inhibition test methods for use in the culture of western king prawns, *Penaeus latisulcatus* (Kishinouye). *Aquaculture*, 272: 231-239.
- Hardiningsih, R., R.N.R. Napitupulu & T. Yulinery. 2006. Isolasi dan uji resistensi beberapa isolat *Lactobacillus* pada pH rendah. *Biodiversitas*, 7(1): 15-17.
- Hjelm, H., O. 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.
- Huang, R.F. 2005. *Vibrio alginolyticus* in the grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish Sci.*, 24:1-3 (in Chinese with English abstract).
- Nayak, S.K. 2010. Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish & Shellfish Immunology*, 29:2-14.
- Nitimulyo, K.H., A. Isnansetyo, Triyanto, I. Istiqomah & M. Murdjani. 2005. Isolasi, identifikasi dan karakterisasi *Vibrio* spp. Patogen penyebab Vibriosis pada Kerapu di Balai Budidaya Air Payau Situbondo. *J. Perikanan*, VII (2): 80-94.
- Nursyirwani., W. Asmara, A.E.T.H. Wahyuni & Triyanto. 2011. Isolasi bakteri asam laktat dari usus ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) dan potensinya sebagai antivibrio. *Ilmu Kelautan*, 16 (2): 70-77.
- Panigrahi, A., V. Kiron, J. Puangkaew, T. Kobayashi, S. Satoh & H. Sugita. 2005. The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 243: 241-254.
- Pierre S, S. Gaillard, N. Prévot-D'Alvise, J. Aubert, O. Rostaing-Capaillon & D. Leung-Tack. Grouper aquaculture: Asian successes and Mediterranean trials. *Aquatic Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.* 18:297-308.
- Son, V.M., C.C. Chang, M.C. Wu, Y.K. Guu, C.H. Chiu & W. Cheng. 2009. Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*. *Fish Shellfish Immunol.*, 26: 691-698.
- Sun, Y.Z., H.L. Yang, R.L. Ma & W.Y. Lin. 2010. Probiotic applications of two dominant gut *Bacillus* strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology*, 29: 803-809.
- 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.
- Vieira, F.N., F.S. Pedrotti, C.C.B. Neto, J.L.P. Mouriño, E. Beltrame, M.L. Martins, C. Ramirez & L.A.V. Arana. 2007. Lactic-acid bacteria increase the survival of marine shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after infection with *Vibrio harveyi*. *Brazilian J. of Oceanography*, 55(4): 251-255.
- Vine, N.G., W.D. Leukes, H. Kaiser, S. Daya, J. Baxter & T. Hecht. 2004. Competition for attachment of

- aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *J. Fish Dis.*, 27: 319–326.
- Wang Y.B., J.R. Li & J. Lin. 2008. Probiotics in aquaculture: challenges and outlook. *Aquaculture*, 281:1-4.
- Watson, A.K., H. Kaspar, M.J. Lategan & L. Gibson. 2008. Probiotic in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274: 1-14.