

**ISOLATION OF PROBIOTIC BACTERIA CANDIDATES ISOLATED
FROM BARRAMUNDI (*Lates calcarifer*) ANTAGONISTIC
AGAINST *Vibrio alginolyticus***

By

Afrimansyah¹), Nursyirwani²), Dessy Yoswaty²)

Abstract

Probiotic is an alternative substance to prevent fish diseases which is environmentally friendly. The research purpose was to isolate potential probiotic to control bacteria pathogen in barramundi (*Lates calcarifer*) to control the bacteria pathogen. The probiotic bacteria candidates were isolated from intestine of barramundi by using the spread and streak methods on MRS and TSA media. The antibacterial activity was examined by using disc diffusion agar method on Zobell 2216E medium. The results showed thirty eight isolates were found which consisted of coccus, white, orange and yellow colonies. Twelve isolates had inhibition against *Vibrio alginolyticus*, two isolates showed highest inhibition zone and antivibrio activities. The highest inhibition zone ($10.04 \pm 1,48$ mm) and ($9,50 \pm 2,12$ mm) and the antivibrio activities (4.04 mm) and (3.50 mm) were indicated by KPMU2-5 and KPMU2-6 isolates respectively.

Keywords: Probiotics, Isolation, Barramundi, Antagonistic.

¹) Student at Faculty of Fisheries and Marine Sciences, Riau University.

²) Lecturer at Faculty of Fisheries and Marine Sciences, Riau University.

PENDAHULUAN

Pengembangan usaha budidaya ikan kakap putih (*Lates calcarifer*), petani ikan sering mengalami kerugian yang disebabkan oleh penyakit ikan. Salah satunya adalah infeksi penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Vibrio alginolyticus*. Bakteri *V. Alginolyticus* merupakan bakteri yang bersifat patogen yang dapat menyebabkan kematian pada ikan kakap putih. Salah satu alternatif yang dapat digunakan untuk mengatasi serangan vibriosis pada ikan ialah penggunaan probiotik, karena probiotik tidak terakumulasi dalam tubuh ikan dan tidak menyebabkan sifat resistensi pada organisme patogen.

Probiotik merupakan pangan yang mengandung sejumlah bakteri yang memberikan efek yang menguntungkan kesehatan organism dengan memperbaiki keseimbangan mikroflora intestinal sehingga dapat memberikan keuntungan perlindungan, proteksi penyakit dan perbaikan daya cerna pada ikan (Purwadhani dan Rahayu, 2003).

Penggunaan probiotik pada akuakultur adalah antisipasi sebagai strategi yang paling baik untuk pencegahan dari infeksi mikroba, mengganti antibiotik dan khemoterapi. Organisme yang umum dipersiapkan dalam probiotik adalah bakteri asam laktat. Bakteri tersebut dijumpai disebagian besar lambung hewan sehat (Zizhong *et al.*, 2009).

Penelitian bertujuan untuk mengisolasi bakteri yang berpotensi sebagai probiotik yang dapat diaplikasikan dalam menekan atau menghambat bakteri patogen untuk pengendalian penyakit pada ikan kakap putih (*L. calcarifer*). Isolat bakteri calon probiotik yang didapatkan dari hasil penelitian diharapkan dapat dimanfaatkan dalam budidaya ikan kakap putih dan ikan laut lainnya sebagai antibiotik.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini telah dilaksanakan pada Bulan Juni sampai Juli 2014. Pengambilan sampel Ikan kakap putih (*L. calcarifer*) berada di dua lokasi yaitu; di Desa Bantan Air (Kabupaten Bengkalis) dan Desa Sialang Pasung (Kabupaten Meranti) Provinsi Riau. Selanjutnya proses isolasi bakteri calon probiotik pada ikan kakap (*L. carcarifer*), identifikasi dan uji antagonis dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Laut Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Riau.

Bahan yang digunakan adalah Saluran pencernaan ikan kakap putih (*Lates carcarifer*). Bahan yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri calon probiotik adalah *Trypticase Soy Agar* (TSA, Oxoid), *Tryptone Soy Broth* (TSB), Media Zobell, *de Mann Rogosa Sharpe* (MRS) agar dan cair (Merck, Darmstadt, Germany) pH 5,7. Adapun bahan lain yang diperlukan untuk menumbuhkan dan melakukan uji sensitivitas bakteri calon probiotik ialah : Aquades, Larutan *Phospat Buffer Saline* (PBS) pH 2 sampai 6, NaCl 1%, NaOH %, Air Laut 20⁰/₁₀₀, alkohol 70 %, larutan safranin, larutan iodin, larutan kristal violet, larutan H₂O₂ 3 %, kertas cakram dan *chloramphenicol*.

Peralatan yang digunakan antara lain *autoclave*, *incubator*, *vortex*, pH meter dan *cool box*, mikroskop binokuler, lemari pendingin dan *freezer*, *magnetic stirrer*, tabung reaksi, cawan petri, pipet ukur, jarum inokulum, mikropipet 100 µl dan 1000 µl, dan lampu bunsen serta alat-alat gelas yang umum digunakan di Laboratorium Mikrobiologi Laut serta alat tulis.

Metode penelitian adalah metode eksperimen yaitu melakukan analisa terhadap objek penelitian. Selanjutnya untuk mengumpulkan data primer peneliti harus melakukan pengujian dan pengamatan. Data sekunder diperoleh dari studi pustaka dan diskusi dengan pembibing serta pihak yang terkait.

1. Penapisan dan Isolasi Bakteri Calon Probiotik

Penapisan bakteri dilakukan untuk memperoleh isolat bakteri calon probiotik dari ikan kakap putih (*L. calcarifer*) yang akan digunakan untuk menghambat dan membunuh aktivitas bakteri *V. alginolyticus* dengan cara penyebaran (*spread methode*) dan cara teknik isolasi goresan (*streak methode*). Isolasi bakteri calon probiotik dilakukan menurut prosedur Brucio *et al.* (2006). Ikan kakap putih sebanyak 4 ekor dinekropsi, diambil ususnya, dibuka dan dibuang isinya Selanjutnya dinding usus bagian dalam dikerok dengan

menggunakan spatula steril kemudian mukus usus diambil sebanyak 1 ml dan dihomogenkan masing-masing di dalam 9 ml larutan *Phospat Buffer Saline* (PBS) pH 2, 3, 4, 5 dan 6. Selanjutnya diambil 0.1 ml dan disebarakan pada medium MRS agar dan untuk media TSA dilakukan dengan cara menggores secara *zig zag*, lalu diinkubasi di dalam inkubator pada suhu 30°C selama 24 - 48 jam.

2. Identifikasi Bakteri Calon Probiotik

Semua isolat bakteri yang sudah ditumbuhkan diidentifikasi berdasarkan pengamatan morfologi sel dan koloni, uji biokimia berupa uji Gram dan katalase serta dilakukan uji sensitivitas. Selanjutnya disimpan dalam refrigerator (setelah ditambahkan glyserol 30%) pada suhu -4°C untuk selanjutnya dilakukan identifikasi (Buntinet *al.*, 2008).

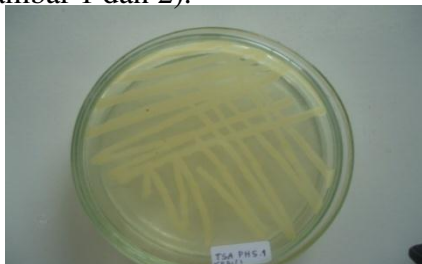
3. Uji Sensitifitas Bakteri Probiotik Terhadap Bakteri *Vibrio alginolyticus*

Uji sensitifitas bakteri atau potensi daya hambat kandidat bakteri probiotik dapat dilakukan dengan melihat ada tidaknya zona hambat di sekitar kertas cakram dan diukur diameter zona hambat tersebut. Uji ini bertujuan untuk memperoleh kandidat bakteri probiotik yang dapat berkompetisi dengan bakteri *V. alginolyticus*. Uji daya hambat menggunakan kertas cakram. Uji sensitivitas Antibakteri menggunakan metode *paperdisc diffusion agar* pada *double layer agar* (Davidson dan Parish dalam Nursyirwarni, 2013). Sebanyak satu ose dari masing-masing isolat diinokulasi pada 5 ml medium TSB cair dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C. Sebanyak 50 µl dari kultur cair tersebut ditetaskan pada *paperdisc* (kertas cakram), kemudian didiamkan selama 15 menit (aseptis) supaya meresap sempurna. *Paperdisc* selanjutnya diletakkan diatas usapan bakteri patogen *V. alginolyticus* pada medium agar Zobell selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C. Kemampuan penghambat pertumbuhan patogen ditandai dengan terbentuknya zona jernih di sekitar *paperdisc*. Sebagai kontrol positif digunakan *chloramphenicol* dan kontrol negatif digunakan (TSB). Zona hambat dihitung dengan mengukur diameter zona jernih disekitar *paperdisc* (dalam mm) dengan menggunakan kaliper. Pengujian dilakukan sebanyak dua kali ulangan untuk setiap isolat.

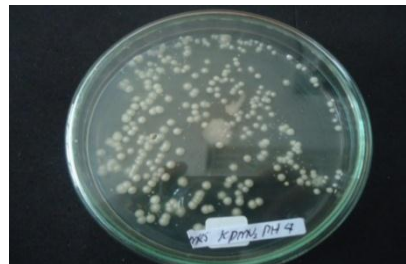
HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Isolasi Bakteri Calon Probiotik

Isolat calon probiotik yang diperoleh dari saluran pencernaan ikan kakap putih sebanyak 38 Isolat yaitu 17 isolat dari KPBU1, 11 isolat dari KPBU2 dan 10 isolat masing masing dari KPMU1 dan KPMU2. Namun, jika dibagi berdasarkan media tumbuh maka diperoleh 22 isolat tumbuh di medium TSA dan 16 isolat tumbuh pada medium MRS. Adapun hasil isolat bakteri yang tumbuh dapat dilihat (Gambar 1 dan 2).



Gambar 1. Isolat Bakteri yang tumbuh pada medium TSA.



Gambar 2. Isolat Bakteri yang tumbuh pada medium MRS.

2. Karakteristik Bakteri Calon Probiotik

Setelah dilakukan isolasi bakteri, dilakukan pengamatan morfologi dan uji biokimia seperti uji gram dan uji katalase terhadap isolat calon bakteri probiotik. Adapun hasil pengamatan dapat dilihat pada (Lampiran 1).

Bakteri calon probiotik dapat tumbuh pada pH 2 sampai 6 di media TSA. Koloni isolat dari ikan kakap putih yang tumbuh pada medium TSA umumnya berbentuk bulat dengan diameter 0,3 – 5,4 mm, berwarna putih/krem, orange dan kuning (Lampiran. 1). Koloni isolat yang tumbuh pada MRS agar berbentuk bulat dengan diameter 0,3 – 3,0 mm, berwarna putih (Lampiran 2).

Berdasarkan Tabel. 4 terlihat bahwa hampir semua isolat yang tumbuh pada medium MRS yang diuji bersifat gram positif dan katalase negatif. Hasil uji tersebut hampir sama dengan isolat yang ditumbuhkan pada medium TSA yaitu Gram positif dan katalase negatif.

Menurut Hadioetomo (1993) Bakteri Gram positif terlihat berwarna ungu karena asam-asam ribonukleat pada sitoplasma sel-sel gram positif membentuk ikatan yang lebih kuat dengan kompleks ungu kristal violet sehingga ikatan kimiawi tersebut tidak mudah dipecahkan oleh pemucat warna. Berdasarkan kemampuan untuk tumbuh dan membentuk warna koloni putih dengan katalase negatif dan Gram positif ini berarti hampir semua isolat memiliki kesamaan dengan bakteri asam laktat yang bersifat probiotik. Hal tersebut hampir sama dengan hasil yang diperoleh oleh Nursyirwani *et al.* (2013) yang menemukan bakteri asam laktat yang bersifat katalase negatif dan gram positif. Seluruh bakteri probiotik merupakan gram positif (Feliatra, 2012).

Proses isolasi calon probiotik yang diperoleh dari saluran pencernaan ikan kakap putih lebih banyak tumbuh di media TSA dari pada media MRS, Hal ini disebabkan karena media TSA lebih bersifat umum dibandingkan media MRS. Media MRS bersifat khusus yaitu hanya bisa ditumbuhi oleh bakteri asam laktat.

Proses isolasi dari saluran pencernaan diuji berdasarkan pH asam yaitu ; pH 2, pH 3, pH 4, pH 5 dan pH 6 tujuannya ialah untuk mencari pH yang optimal untuk pertumbuhan bakteri probiotik. Menurut Kanmani *et al.* (2010) salah satu karakteristik bakteri probiotik yaitu memiliki ketahanan terhadap kondisi asam yang tinggi.

Salah satu kriteria yang harus dimiliki oleh BAL yang berpotensi sebagai probiotik adalah kemampuannya untuk menghambat bakteri patogen dan mampu berkompetisi dengan bakteri patogen untuk mempertahankan keseimbangan mikroflora usus (Gildberg, 1997). Pelczar dan Chan *dalam* Munatin dan Khanifa (2012) juga mengatakan bahwa BAL dapat hidup pada kisaran pH yang luas. Salah satu faktor penting dalam pertumbuhan bakteri adalah nilai pH karena akan mempengaruhi pertumbuhan bakteri dan aktivitas enzim.

Semua isolat yang tumbuh bervariasi bentuk dan warnanya. 24 isolat berwarna putih yaitu 16 isolat pada media MRS dan 8 isolat pada medium TSA, 11 isolat berwarna orange, 3 isolat berwarna kuning. Hal tersebut hampir sama dengan yang dilakukan pada penelitian yang sebelumnya yang dilakukan oleh (Ilmiah *et al.*, 2012) menjelaskan penampilan koloni isolat kandidat probiotik memiliki variasi warna koloni terdiri dari krem, putih, putih susu, putih transparan, putih kekuningan dan kuning. Ukuran dan bentuk koloninya juga bermacam-macam ada yang bundar besar dan bundar kecil. Menurut Hidayat *et al.* (2006) bentuk koloni dari suatu bakteri dipengaruhi oleh umur dan syarat

pertumbuhan tertentu. Variasi bentuk bakteri yang terjadi juga dipengaruhi oleh lingkungan (faktor biotik dan abiotik), faktor makanan (medium tumbuh) dan suhu.

3. Aktivitas bakteri calon probiotik terhadap *V. alginolyticus*

Aktivitas bakteri calon probiotik dapat dilakukan dengan uji sensitivitas yaitu melihat ada tidaknya zona hambat disekitar kertas cakram dan diukur diameter zona hambat tersebut. Uji ini bertujuan untuk memperoleh bakteri calon probiotik yang dapat berkompetisi dengan bakteri *V. alginolyticus*. Uji sensitivitas menggunakan kontrol positif yaitu *chloramphenicol* dan untuk kontrol negatif menggunakan TSB serta ukuran kertas cakram yang digunakan ialah 6,00 mm. Berdasarkan uji sensitivitas dilakukan terhadap bakteri *V. alginolyticus* bahwa isolat bakteri calon probiotik tersebut mampu menghambat bakteri *V. alginolyticus* (Gambar. 3).



Gambar 3. Uji Sensitivitas Bakteri Calon Probiotik.

Berdasarkan Gambar 3. terlihat ada kemampuan isolat bakteri untuk menghambat pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus*, dimana zona jernih ditunjukkan oleh kontrol positif dan isolat yang diuji. Aktivitas anti vibrio adalah diameter zona hambat dikurangi dengan diameter paperdisc (6 mm) (Isnansetyo dan Triyatno, 2007). Hasil uji terhadap isolat isolat yang diperoleh disajikan pada Tabel. 1.

Tabel 1. Zona hambat dan aktivitas anti *V. alginolyticus* isolat calon probiotik Pada media TSA.

Kode Isolat	Rata-rata Diameter Zona Hambat Probiotik (mm)	Aktivitas anti <i>V. alginolyticus</i> (mm)
Kontrol (+)	17,52 ± 2,60	11,00
Kontrol (-)	6,00 ± 0,00	0,00
KPBU1-2	7,50 ± 0,57	1,50
KPBU1-3	7,80 ± 0,42	1,80
KPBU1-4	7,95 ± 1,34	1,95
KPBU1-5	7,45 ± 0,35	1,45
KPBU1-6	7,55 ± 0,07	1,55
KPBU1-2	7,60 ± 0,57	1,60
KPBU2-3	8,10 ± 1,56	2,10
KPBU2-5	10,05 ± 1,48	4,05
KPBU2-6	9,15 ± 3,04	3,15

Sumber : Data Primer (2014)

Keterangan:

1. Kontrol Positif (*chloramphenicol*)
2. Kontrol Negatif (TSB)

Berdasarkan Tabel 1. terlihat nilai rata-rata daya hambat isolat yang diisolasi pada medium TSA terhadap bakteri *V. alginolyticus* berkisar antara 7,45 sampai 10,05 mm, Nilai daya hambat yang paling tertinggi ialah isolat KPBU2-5 sebesar 10,05 mm dan aktivitas anti *V. alginolyticus* 4,05 mm dan nilai hambat yang terendah ialah KPBU2-2 sebesar 7,45 mm dan anti *V. Alginolyticus* 1,45 mm. Uji daya hambat isolat yang tumbuh pada medium MRS terhadap *V. alginolyticus* disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Zona hambat uji antagonisme isolat bakteri calon probiotik pada medium MRS terhadap bakteri *V. Alginolyticus*.

Kode Isolat	Rata-rata Diameter Zona Hambat Probiotik (mm)	Aktivitas anti <i>V. alginolyticus</i> (unit)
Kontrol (+)	17,52 ± 2,60	11,00
Kontrol (-)	6,00 ± 0,00	0,00
KPMU1-2	9,10 ± 0,00	3,10
KPMU1-3	9,20 ± 0,42	3,20
KPMU1-4	8,90 ± 0,42	2,90
KPMU1-5	8,60 ± 0,85	2,60
KPMU1-6	8,40 ± 0,42	2,40
KPMU2-2	8,25 ± 0,07	2,25
KPMU2-3	6,80 ± 0,14	0,80
KPMU2-4	9,50 ± 2,12	3,50
KPMU2-5	8,15 ± 0,21	2,15
KPMU2-6	8,10 ± 0,14	2,10

Sumber : *Data Primer (2014)*

Keterangan:

1. Kontrol Positif (*Chloramphenicol*)
2. Kontrol Negatif (TSB)

Berdasarkan Tabel 2. terlihat nilai daya hambat isolat yang diisolasi pada medium MRS terhadap bakteri *V. alginolyticus* berkisar *alginolyticus* berkisar antara 6,80 sampai 9,50 mm, Nilai daya hambat yang paling tertinggi ialah isolat KPMU2-4 sebesar 9,50 mm dan aktivitas anti *V. alginolyticus* 4,05 mm nilai hambat yang terendah ialah KPMU2-3 sebesar 6,80 mm,

Nilai hambat isolat bakteri rata-rata diatas 6 mm, ini disebabkan oleh ukuran kertas cakram yang digunakan sehingga ukuran luasan usapan bakteri pada saat uji mencapai 6 mm, Namun, itu tidak menjadi alasan utama karena masih ada faktor lain yaitu aktivitas enzim yang dihasilkan oleh bakteri calon probiotik.

Isolat KPBU2-5 dan KPMU2-4 mempunyai kemampuan yang lebih besar untuk menghambat dan membunuh bakteri *V. alginolyticus*, dan bisa diduga KPBU2-5 dan KPMU2-4 mampu menghasilkan bakteriosin yang lebih banyak dibandingkan isolat KPBU dan KPMU yang lainnya. Munatin dan Khanifa (2012) mengatakan kemampuan bakteri asam laktat untuk menekan pertumbuhan bakteri patogen disebabkan karena kemampuannya untuk memproduksi senyawa antimikroba seperti asam laktat dan asam asetat, hidrogen peroksida yang cukup besar dan bakteriosin. Verschuere *et al.* (2000) mengatakan bahwa secara umum kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri lain dikarenakan satu atau kombinasi dari beberapa faktor seperti: produksi antibiotik, bakteriosin, siderophores, lisosim, protease, dan atau hidrogen peroksida atau mempengaruhi pH media dengan menghasilkan zat organik tertentu.

Banyak penelitian sebelumnya menyatakan bahwa bakteri probiotik berperan aktif dalam menghambat bakteri patogen seperti yang dilakukan oleh Vine *et al.* (2004) mendapatkan 1 isolat dari saluran pencernaan ikan badut yang bersifat antagonis terhadap *V. alginolyticus*. Bourouni *et al.* (2007) mendapatkan 11 isolat yang aktif terhadap *Vibrio sp.*, Balczar *et al.* (2008) mendapat 3 isolat yang menghambat pertumbuhan *V. anguillarum* dan *Yersenia ruckeri*. Hatmanti *et al.* (2009) 9 isolat mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen. 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 *V. anguillarum* dan *Aeromonas salmonicida sub sp. Salmonicida*. Nursyirwani *et al.* (2013) mendapatkan 21 isolat bakteri yang diisolasi dari ikan kerapu yang mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *V. alginolyticus*.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Isolasi bakteri calon probiotik dari saluran pencernaan ikan kakap putih diperoleh 38 isolat calon bakteri probiotik yang dapat tumbuh pada kondisi asam. Koloni isolat dari ikan kakap putih yang tumbuh pada medium TSA umumnya berbentuk bulat dengan diameter 0,3 – 5,4 mm. 11 isolat berwarna orange, 3 warna kuning dan 24 isolat berwarna putih. Koloni isolat yang tumbuh pada MRS agar berbentuk bulat dengan diameter 0,3 – 3,0 mm dan berwarna putih.

Semua isolat yang diuji memiliki daya hambat terhadap bakteri *V. alginolyticus*. Uji sensitivitas tertinggi ditunjukkan oleh 2 isolat, KBPU2-5 dengan rata-rata diameter zona hambat 10,04 mm dan aktivitas antivibrio 4,01 unit. KPMU2-6. dengan rata-rata diameter zona hambat 9,05 mm dan aktivitas antivibrio 3,05 unit.

Saran

Penelitian selanjutnya disarankan perlu dilakukan uji biokimia lanjutan dan uji genetik untuk memperoleh genus dan spesies. Disarankan juga dilakukan uji antagonis terhadap bakteri lain seperti: *Aeromonas hydrophilla*, *Pseudomonas* dan *Streptococcus agalactae*. dan analisis metabolit sekunder yang dihasilkan oleh bakteri.

Ucapan Terima Kasih

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada Ibu Dr.Ir. Nursyirwani, M.Sc selaku pembimbing I dan kepada Ibu Dr. Dessy Yoswaty, S.Pi, M.Si selaku pembimbing II yang banyak memberikan masukan dan arahan kepada penulis dalam penelitian, serta rekan rekan yang telah membantu dan memberikan motivasi kepada penulis.

DAFTAR PUSTAKA

- Balcazar, J.L., I. de Blass, I. Ruiz-Zarzuola, D. Cunningham, D. Vendrell and J.L.Muzquiz. 2006. *The role of probiotics in aquaculture*. *Vet Microbiol.*, 114: 173-186.
- Bourouni OC, El Bour Mt, Mrauna R, Abdennaceur H, Boudabous A. 2007. Preliminary selection study of potential probiotic bacteria from aquacultural area in Tunisia. *Annals of Microbiology* 57: 185–190.
- Brucio, A.,R. Hartemink,J.W. Sacrama. J. Vereeth and F.M. Rombouts. 2006. *Presence lactobacilli in theIntestinal content of freshwater fish from a river and from a farm with a circulation system*. *Food Microbiologu*, 23: 476-482.
- Buntin N., S. Chantachum and T. Hongpattarakere. 2008 screening of lactic acid bacteria from gastrointertinal tracts of marine fishfor their potential use as probiotics. *Songklanakarinn journal of sciene and technology*, 30 (Suppl.1):141-148.
- Feliatra, Fitria. Y, Nursyirwani, 2012. Antagonis bakteri probiotik yang diisolasi dari usus dan lambung ikan kerapu bebek (*cromileptes altivelis*) terhadap bakteri patogen. *Jurnal perikanan dan kelautan* 17.Pekanbaru Hal:16-25
- Fjellheim AJ, Klinkenberg G, Skjermo J, Aasen IM, Vadstein O. 2010. Selection of candidate probiotics by two different screening strategies from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Veterinary Microbiology* 144: 153–159.
- Ilmiah, Sukenda,Widanarni, Haris. E, 2012.*Seleksi bakteri probiotik dari terumbu karang dan lingkungan budidaya ikan kerapu macan (Epinephelus fuscoguttatus)*.*Jurnal Akuakultur Indonesia* 11(2),.Bogor.hal 109–117
- Isnansetyo, A. dan Triyanto. 2007. Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri Penghasil Antibiotik, Strain S2V2 dan RLP. Laporan Penelitian Fundamental Perguruan Tinggi Tahun Anggaran 2007. Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. 35 hal.
- Nursyirwani, W. Asmara, A.E.T.H. Wahyuni dan Triyanto. 2011. Isolasi bakteri asam laktat dari usus ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) dan potensinya sebagai antivibrio. *Ilmu Kelautan. Indonesian Journal of Marine Sciences*, 16(2): 70-77.
- Pelczar, M. J. & E. C. S. Chan. 2007. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Universitas Indonesia Press, Jakarta.
- Suwarsih, 2012. Isolasi dan identifikasi bakteri probiotik dari ikan kerapu macan (*Ephinephelus fuscogatus*) dalam upaya efisiensi pakan ikan. *Prospektus*, Tahun IX Nomor 1.
- Vine, N.G., W.D. Leukes., H. Kaiser., S. Daya., J. Baxter and T. Hecht. 2004. Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *J. Fish Dis.*, 27:319 326.

Zizhong, Q., Z. Xiao-Hua, N. Boon and P. Bossier. 2009. Probiotics in Aquacultur of China-current State,Problem and Prospect. *Aquaculture* 290 :15-21.

Lampiran 1. Hasil pengamatan morfologi dan uji biokimia isolat bakteri calon probiotik dari ikan kakap putih pada media TSA.

No.	Kode Isolat	pH	Media Tumbuh	Diameter (mm)	Bentuk	Warna	Uji Gram	Uji Katalase
1	KPBU1	2	TSA	3,0	Bundar	putih	(+)	(-)
2	KPBU1	2	TSA	2,5	Bundar	Orange	(+)	(-)
3	KPBU1	2	TSA	1,0	Bundar	putih	(+)	(-)
4	KPBU1	3	TSA	5,4	Bundar	Orange	(-)	(-)
5	KPBU1	3	TSA	1,8	Bundar	putih	(+)	(-)
6	KPBU1	4	TSA	2,2	Bundar	Kuning	(+)	(-)
7	KPBU1	4	TSA	4,5	Bundar	Orange	(+)	(-)
8	KPBU1	5	TSA	4,0	Bundar	Orange	(+)	(-)
9	KPBU1	6	TSA	2,8	Bundar	Orange	(-)	(-)
10	KPBU1	6	TSA	2,2	Bundar	putih	(-)	(-)
11	KPBU1	6	TSA	2,7	Bundar	Orange	(-)	(-)
12	KPBU2	2	TSA	1,4	Bundar	putih	(-)	(-)
13	KPBU2	2	TSA	2,8	Bundar	Orange	(-)	(-)
14	KPBU2	3	TSA	2,6	Bundar	putih	(-)	(-)
15	KPBU2	3	TSA	3,3	Bundar	Kuning	(-)	(-)
16	KPBU2	3	TSA	1,6	Bundar	putih	(-)	(-)
17	KPBU2	5	TSA	2,9	Bundar	Orange	(+)	(-)
18	KPBU2	5	TSA	3,7	Bundar	Kuning	(+)	(-)
19	KPBU2	5	TSA	1,9	Bundar	Orange	(+)	(-)
20	KPBU2	6	TSA	1,6	Bundar	Orange	(+)	(-)
21	KPBU2	6	TSA	2,5	Bundar	putih	(+)	(-)
22	KPBU2	6	TSA	1,5	Bundar	Orange	(+)	(-)

Sumber : *Data Primer (2014)*

Keterangan:

1. KPBU1(Kakap Putih Bengkalis- Usus ke-1)
2. KPBU2(Kakap Putih Bengkalis- Usus ke-2)

Lampiran 2. Hasil pengamatan morfologi dan uji biokimia isolat bakteri calon probiotik dari ikan kakap putih.

No.	Kode Strain	pH	Medium Pertumbuhan	Diameter (mm)	Bentuk	Warna	Uji Gram	Uji Katalase
1	KPBU1	2	MRS	2,2	Putih	Bundar	(+)	(-)
2	KPBU1	2	MRS	1,2	Putih	Bundar	(+)	(-)
3	KPBU1	5	MRS	3,0	Putih	Bundar	(+)	(-)
4	KPBU1	5	MRS	2,5	Putih	Bundar	(+)	(-)
5	KPBU1	6	MRS	1,6	Putih	Bundar	(+)	(-)
6	KPBU1	6	MRS	1,5	Putih	Bundar	(+)	(-)
7	KPMU1	2	MRS	1,9	Putih	Bulat	(+)	(-)
8	KPMU1	3	MRS	1,1	Putih	Bulat	(+)	(-)
9	KPMU1	4	MRS	2,5	Putih	Bulat	(+)	(-)
10	KPMU1	5	MRS	1,2	Putih	Bulat	(+)	(-)
11	KPMU1	6	MRS	2,4	Putih	Bulat	(+)	(-)
12	KPMU2	2	MRS	1,5	Putih	Bulat	(+)	(-)
13	KPMU2	3	MRS	0,3	Putih	Bulat	(+)	(-)
14	KPMU2	4	MRS	0,5	Putih	Bulat	(-)	(-)
15	KPMU2	5	MRS	0,3	Putih	Bulat	(+)	(-)
16	KPMU2	6	MRS	1,9	Putih	Bulat	(+)	(-)

Sumber : *Data Primer (2014)*.

Keterangan:

1. KPBU1(Kakap Putih Bengkalis- Usus ke-1)
2. KPMU1(Kakap Putih Meranti- Usus ke-1)
2. KPMU2(Kakap Putih Meranti- Usus ke-2)