Jenis Artikel : Full Paper

**EFEKTIVITAS PEMBERIAN MIKROKAPSUL PROBIOTIK TERHADAP KOMPOSISI BAKTERI PADA USUS IKAN KERAPU MACAN *Epinephelus fuscogutattus* (Forsskal, 1775)**

**Effectiveness Of Probiotic Microcapsules On Bacterial Composition In The Tiger Grouper Intestine *Epinephelus fuscogutattus* (Forsskal, 1775)**

**Goesti Rara Firanti1, Wardiyanto1 dan Esti Harpeni2**

1Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung, Jl. Prof. Dr. Soemantri Brojonegoro, No. 1, Bandar Lampung, 35145, Indonesia

2Program Studi Ilmu Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung, Jl. Prof. Dr. Soemantri Brojonegoro, No. 1, Bandar Lampung, 35145, Indonesia

rarafiranti@gmail.com

**Abstrak**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian mikrokapsul probiotik terhadap komposisi bakteri pada usus ikan Kerapu Macan *(Epinephelus fuscogutattus*). Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan lima perlakuan dan tiga ulangan, yaitu perlakuan K+ (Pemberian pakan dengan probiotik tanpa mikrokapsul), K- (Pemberian pakan tanpa penambahan probiotik), A (Pemberian mikrokapsul probiotik dengan dosis 1g/kg pakan), B (Pemberian mikrokapsul probiotik dengan dosis 2g/kg pakan), dan C (Pemberian mikrokapsul probiotik dengan dosis 3g/kg pakan). Parameter yang diamati meliputi viabilitas sel bakteri *Bacillus* sp. D2.2, komposisi bakteri pada usus Kerapu Macan, kelimpahan bakteri asam laktat dan kelimpahan *Bacillus* sp. D2.2. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat pengaruh pemberian mikrokapsul probiotik terhadap komposisi bakteri pada usus Kerapu Macan. Mikrokapsul probiotik mampu mempengaruhi viabilitas bakteri probiotik dan kelimpahan bakteri asam laktat.

Kata Kunci : *Bacillus* sp. D2.2, Bakteri Asam Laktat, Probiotik, Kelimpahan Bakteri, Viabilitas

**Abstract**

This study was aimed to determine the effect of probiotic microcapsules on the bacterial composition on tiger grouper (*Epinephelus fuscogutattus*) intestine. The experimental design was used completely randomized design with five treatments and three replications, namely K + (Fed with probiotics without microcapsules), K- (Fed without the addition of probiotics), A (Fed with 1 g/kg microcapsules probiotics dose of feed), B (Fed with 2 g/kg microcapsules probiotics dose of feed), and C (Fed with 3 g/kg microcapsules probiotics dose of feed). The observed parameters were probiotic cell viability, bacterial composition on tiger grouper intestine, abundance of lactic acid bacteria and abundance of *Bacillus* sp. D2.2. The results showed that probiotic microcapsules had the effect on bacterial composition in the intestines of tiger grouper. Probiotic microcapsules could affect the viability of probiotic bacteria and also affect the abundance of lactic acid bacteria.

Keywords : *Bacillus* sp. D2.2, Lactic acid bacteria, Probiotic, Bacterial abundance, Viability

**PENDAHULUAN**

Pada kegiatan budidaya ikan Kerapu Macan rentan terhadap penyakit. Penyakit yang paling sering ditemukan menyerang ikan Kerapu Macan ialah penyakit vibriosis, yakni penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Vibrio* sp. Bakteri ini biasa menyerang pada saluran pencernaan sehingga mengakibatkan ikan terlihat lemah dan kehilangan nafsu makan. Salah satu penyebab adanya *Vibrio* pada usus kerapu macan ialah karena komposisi bakteri pada usus Kerapu Macan yang tidak mampu melawan bakteri patogen tersebut. Bakteri yang biasanya ditemukan pada usus dapat berupa bakteri asam laktat, mikroflora normal usus ikan tersebut ataupun bakteri patogen.

Pemberian probiotik menjadi pilihan untuk masalah ini karena probiotik dapat merangsang pertumbuhan bakteri asam laktat dan meningkatkan kinerja bakteri alami pada usus (Irianto, 2007). Namun pemberian probiotik langsung ke air budidaya atau dicampurkan ke pakan begitu saja dirasa kurang efektif karena bakteri probiotik tidak dapat dipastikan masuk ke dalam saluran pencernaan. Metode mikroenkapsulasi merupakan solusi untuk kasus ini, mikroenkapsulasi merupakan teknik yang digunakan untuk melapisi probiotik dengan suatu lapisan dinding polimer, sehingga menjadi partikel-partikel kecil berukuran mikro. Dengan adanya lapisan dinding polimer ini, probiotik akan terlindungi dari pengaruh lingkungan luar (Triana et al., 2006). Pada penelitian ini bakteri yang digunakan ialah *Bacillus* sp. D2.2. Bakteri *Bacillus* sendiri termasuk ke dalam bakteri asam laktat yaitu bakteri yang paling sering dijadikan probiotik. Oleh karena itu, perlu adanya penelitian mengenai pemberian mikrokapsul probiotik pada pakan untuk mengontrol komposisi bakteri pada usus Kerapu Macan dan *Bacillus* sp. D2.2 sebagai sistem pertahanan terhadap kolonisasi patogen dan pelekatan bakteri pada saluran pencernaan ikan (Ringo et al., 2003).

**METODELOGI**

**Waktu dan Tempat**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei sampai Juni 2019 di Laboratorium Budidaya Perikanan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung serta Balai Besar Perikanan Budidaya Laut (BBPBL) Lampung.

**Alat dan Bahan**

Labu erlenmeyer, cawan petri, *shaker*, autoklaf, jarum ose, *centrifuge*, *freeze dryer*, *sprayer*, *box storage*, bak kontainer, aerator, timbangan digital, selang sipon, serokan, timbangan digital, alat bedah, mikropipet, inkubator, jarum ose, *spreader*, isolat bakteri *Bacillus* sp. d2.2, media SWC agar, media SWC *broth*, rifampisin, PBS steril, air laut steril, maltodekstrin, susu skim, pakan komersial, air, putih telur, ikan kerapu macan ukuran 5-7 cm, pakan yang sudah tercampur mikrokapsul probiotik, air laut, sampel usus, media TSA , media mRSA, aquades, NaCl , test microbact GNB.

**Rancangan Penelitian**

Pakan perlakuan diberikan selama selama 28 hari dan dilakukan sampling pada hari ke-0, 7, 14, 21 dan 28. Penelitian ini terdiri dari 5 perlakuan dan 3 kali ulangan yaitu :

K+ : Pemberian pakan dengan probiotik tanpa mikrokapsul

K- : Pemberian pakan tanpa penambahan mikrokapsul probiotik

A : Pemberian pakan dengan mikrokapsul probiotik dosis 1g/kg pakan

B : Pemberian pakan dengan mikrokapsul probiotik dosis 2g/kg pakan

C : Pemberian pakan dengan mikrokapsul probiotik dosis 3g/kg pakan

**Prosedur Kerja**

 Persiapan probiotik diawali dengan menumbuhkan *Bacillus* sp. D2.2 pada media SWC *broth* 50 ml yang telah diberi penanda resistensi menggunakan antibiotik rifampisin dosis 50 μg/ml. Kemudian diinkubasi dalam water bath shaker dengan kecepatan 140 rpm pada suhu 29oC selama 24 jam. Selanjutnya probiotik ditumbuhkan pada 500 mL SWC Broth selama 18 jam (Putra & Widanarni, 2015). Hasil panen bakteri kemudian dicampurkan dengan dengan perbandingan komposisi probiotik, susu skim dan maltodekstrin sebesar 70%: 10%: 20% dari besaran dosis yang digunakan. Selanjutnya, dilakukan proses *freeze drying* menggunakan *freeze dryer* (Sumanti, 2016). Hasil dari proses *freeze drying* dicampurkan pada pakan komersial dengan metode *repelleting* sesuai dosis yang digunakan.

Pengamatan uji viabilitas dilakukan untuk membandingkan viabilitas sel bakteri sebelum masuk ke dalam usus ikan dan setelah berada di dalam usus antara probiotik yang dimikrokapsul dan yang tidak dimikrokapsulUji viabilitas sebelum masuk ke dalam usus dilakukan dengan cara menginokulasi dari probiotik yang telah dimikrokapsul sedangkan untuk uji viabilitas bakteri setelah berada di usus ikan dilakukan dengan cara mengisolasi bakteri dari sampel usus ikan pada media SWC yang sudah dicampur rifampisin, kemudian dihitung menggunakan metode Angka Lempeng Total (ALT) yaitu perhitungan jumlah koloni yang tumbuh di cawan lalu di hitung berdasarkan rumus sebagai berikut :

N = jumlah koloni per cawan x 1/(Faktor pengenceran) x 1/(Volume pengenceran)

Keterangan :

N : jumlah kepadatan bakteri (CFU /ml)

Faktor pengenceran : Tingkat pengenceran yang dilakukan

Volume pengenceran : Volume pengenceran yang dilakukan

Kelimpahan bakteri asam laktat dan kelimpahan bakteri *Bacillus* sp. D2.2 pada usus ikan Kerapu Macan dilakukan dengan cara mengisolasi bakteri dari usus ikan ke media mRSA untuk BAL dan pada media SWC untuk bakteri *Bacillus* sp. D2.2 dan dihitung menggunakan metode ALT.

Komposisi bakteri pada usus ikan Kerapu Macan dilakuakn dengan cara mengisolasi bakteri dari usus ikan ke media TSA dengan metode tuang, lalu diambil 0,1 ml suspensi dari hasil pengenceran ke media TSA. Bakteri diinkubasi selama 24 - 48 jam pada suhu 37oC (Jimoh, 2014). Bakteri yang terlihat dominan diinokulasi pada media TSA, koloni yang tumbuh diamati warna, bentuk, tepian dan elevasi dan diuji menggunakan Test Kit Microbact GNB 24e, hasil uji diidentifikasi menggunakan buku panduan Cowan & Steel (1993).

**Analisis Data**

Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dan statistik. Data yang diperoleh diolah dengan Microsoft Excel 2013, kemudian dilakukan uji ANOVA dengan menggunakan program komputer SPSS 22 dan diuji lanjut dengan uji Duncan. Data yang dianalisis secara statistik adalah data kelimpahan bakteri asam laktat, dan kelimpahan bakteri *Bacillus* sp. D2.2, sedangkan data uji viabilitas bakteri probiotik dan komposisi bakteri dianalisis secara deskriptif.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Uji Viabilitas Bakteri**

Viabilitas sel Bacillus sp. D2.2 diamati sebelum dan sesudah probiotik masuk ke dalam usus ikan. Dari hasil penelitian ini dapat dilihat bahwa pada hari ke-0 kepadatan bakteri Bacillus sp. D2.2 berjumlah 9,7 x 108 CFU /ml, kemudian sesudah masuk ke dalam tubuh ikan kepadatan bakteri menjadi 1,02 x 108 sampai 1,2x108 CFU /ml untuk perlakuan mikrokapsul dan 9,4x106 CFU /ml untuk perlakuan yang tidak dimikrokapsul.

Tabel 1. Uji Viabilitas Sel Bakteri Probiotik

|  |  |
| --- | --- |
| Perlakuan | Kelimpahan Bakteri Probiotik (CFU /ml) |
| Sebelum | Sesudah |
| Mikrokapsul | A | 9,7 x 108 | 1,02 x 108 ab ± 5,5 |
| B | 1,13 x 108bc ± 7,2 |
| C | 1,2 x 108c ± 1,5 |
| Tanpa Mikrokapsul | 0,94 x 107a ± 9,5 |

\*Huruf yang sama menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata

Keterangan : Sebelum (Probiotik sebelum diberikan pada ikan); Sesudah (Probiotik yang sudah masuk ke dalam usus ikan, pengamatan dilakukan pada hari ke-28)

Pada tabel di atas diketahui bahwa kepadatan bakteri probiotik dengan mikrokapsul dan probiotik tanpa mikrokapsul sama-sama mengalami penurunan namun pada perlakuan mikrokapsul probiotik penurunan viabilitas bakteri tidak sebanyak dibandingkan dengan perlakuan tanpa mikrokapsul. Penurunan viabilitas sel disebabkan oleh kondisi usus ikan yang memiliki kondisi pH dan konsentrasi garam empedu yang rendah. Keberadaan garam empedu di dalam usus mampu melarutkan fosfolipid, kolesterol dan protein. Sebagian besar dari senyawa ter-sebut dapat menyusun membran sel, sehingga menyebabkan sel mikroorganisme menjadi hancur.

Mikrokapsul probiotik dilindungi oleh bahan penyalut yang mampu melindungi probiotik dari kerusakan pada saluran pencernaan Kerapu Macan yang disebabkan oleh aktivitas tersebut. Sumanti (2016), menyatakan bahwa mikrokapsul yang diberikan kepada bakteri dapat melindungi sel bakteri dari pengaruh lingkungan yang dapat menurunkan viabilitas sel bakteri seperti suhu dan bahan kimia.

**Komposisi Bakteri Pada Usus Kerapu Macan**

Hasil identifikasi bakteri berdasarkan buku Cowan & Steel (1993), pada pengamatan hari ke-0 ditemukan bakteri yang dominan pada usus Kerapu Macan ialah bakteri dengan spesies *V. alginolyticus* dan *V. furnissii*. Morfologi koloni dan morfologi sel semua isolat bakteri mempunyai karakter yang hampir sama yaitu berbentuk basil, Gram negatif dan motil. Namun pada pengamatan selanjutnya mulai terjadi perubahan komposisi bakteri pada usus ikan.

Tabel 2. Komposisi Bakteri Dominan pada Usus Kerapu Macan

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Pengamatan hari ke- | Perlakuan | Jenis Bakteri |
| H0 | K- | *V. furnissii, V. alginolyticus* |
| K+ | *V. furnissii, V. alginolyticus* |
| A | 1. *Alginolyticus*
 |
| B | *V. furnissii, V.alginolyticus* |
| C | *V. furnissii* |
| H7 | K- | *V. furnissii, V. alginolyticus* |
| K+ | *V. alginolyticus, B. subtilis* |
| A | *L. casei* |
| B | *V. alginolyticus, L. casei* |
| C | *B. subtilis* |
| H14 | K- | *V. furnissii, V. alginolyticus* |
| K+ | *V. alginolyticus, B. subtilis* |
| A | *L. casei* |
| B | *V. alginolyticus, L. casei* |
| C | *B. subtilis* |
| H21 | K- | *V. furnissii, V. alginolyticus* |
| K+ | *L. casei, B. subtilis* |
| A | *B. subtilis, B. brevis* |
| B | *L. casei, B. subtilis* |
| C | *B. subtilis, B. brevis* |
| H28 | K- | *V. furnissii, V. alginolyticus* |
| K+ | *B. subtilis, B. brevis* |
| A | *B. subtilis, B. brevis* |
| B | *B. subtilis, B. brevis* |
| C | *B. subtilis, B. brevis* |

Bakteri *V. alginolyticus* yang mendominasi usus kerapu macan pada hari ke-0 merupakan bakteri patogen paling ganas yang menyerang Kerapu Macan. Berdasarkan penelitian Herfiani et al (2013), *V. Alginolyticus* merupakan bakteri patogen yang dapat menyebabkan kematian ikan uji sebanyak 100%, gejala yang muncul akibat infeksi bakteri ini berbeda-beda sesuai kepadatan bakteri yang diberikan. Bakteri lain yang ditemukan dominan pada pengamatan hari ke-0 ialah *V.furnissii*, menurut Esteve et al (1995), bakteri ini dapat menyebabkan kematian pada kepadatan 106 CFU/ikan dengan waktu kematian 10 jam setelah diinjeksi. Patogenitas bakteri ini disebabkan oleh produksi eksotoksin yang mendegradasi jaringan protein seperti kolagen dan fibrinogen. Pada pengamatan hari ke-7 mulai terjadi perubahan komposisi bakteri pada usus pada perlakuan K+, A, B dan C.

Bakteri yang tumbuh merupakan bakteri dari Gram positif dengan jenis *L. casei* dan *B. subtilis.* Jenis bakteri lain yang ditemukan pada usus Kerapu Macan pada pengamatan hari ke- 7 dan ke-14 ialah *B. subtilis*. Bakteri ini memiliki peranan dalam kegiatan budidaya sebagai probiotik penghambat pertumbuhan bakteri patogen dan berperan dalam proses pencernaan (Subagiyo & Djunaedi, 2011). Bakteri ini menghasilkan bakteriosin yang merupakan zat antimikroba berupa polipeptida dan protein dan juga mampu meningkatkan sistem imun usus pada ikan (Kone & Fung, 1990). Selain *B. subtilis* ditemukan juga spesies lain dari genus *Bacillus* yaitu *B. brevis* pada usus Kerapu Macan. Berdasarkan penelitian penelitian Mahdhi *et al*., (2012) *B. brevis* memiliki kemampuan menghambat patogen dengan cara *in vitro* dan *in vivo*. Bakteri ini mampu menghasilkan bakteriosin yang berguna sebagai antibiotik.

Diketahui bahwa pada pengamatan hari ke-7 dan ke-14 pada perlakuan Kontrol positif dan B masih ditemukan bakteri *V. alginolyticus*. Pada perlakuan kontrol positif, probiotik diberikan dengan metode *spray* tetap mampu merangsang pertumbuhan bakteri *B. subtilis*. Bakteri ini pada kondisi yang sesuai dan mendukung, populasinya akan menjadi dua kali banyaknya selama waktu tertentu (Soesanto, 2008). Hal ini yang diduga menjadi penyebab bakteri ini mampu mendominasi usus Kerapu Macan dan mampu menekan pertumbuhan bakteri *Vibrio* walaupun waktu yang diperlukan untuk mendominasi usus Kerapu Macan relatif lambat apabila dibandingkan dengan perlakuan mikrokapsul probiotik. Pada perlakuan B pemberian mikrokapsul probiotik mampu merangsang pertumbuhan *L. casei* namun masih ditemukan bakteri *V. alginolyticus* sampai pada pengamatan hari ke-14, sedangkan pada perlakuan A dengan dosis yang lebih rendah keberadaan *V. alginolyticus* sudah tidak mendominasi usus Kerapu Macan.

Pada pengamatan hari ke-0 komposisi bakteri yang mendominasi usus Kerapu Macan pada perlakuan A dan B berbeda, pada perlakuan A usus Kerapu Macan hanya didominasi oleh *V. alginolyticus* sedangkan pada perlakuan B usus Kerapu macan didominasi oleh *V. alginolyticus* dan *V. furnisii*, dengan demikian diduga bahwa *L. casei* mampu menekan pertumbuhan *V. furnisii* lebih cepat dibandingkan *V. alginolyticus*. Hal ini disebabkan karena *L. casei* dan *V. alginolyticus* merupakan jenis bakteri yang sama-sama memiliki toleransi yang tinggi pada garam empedu yang terdapat pada usus Kerapu Macan. Menurut Noguchi *et al* (1987) *V. alginolyticus* merupakan jenis bakteri yang sangat toleran terhadap garam dan dapat tumbuh pada konsentrasi kadar garam 10%. Pada perlakuan A dengan dosis yang lebih sedikit mampu menekan pertumbuhan V. alginolyticus lebih cepat diduga karena L. casei dan probiotik yang diberikan hanya menekan pertumbuhan satu jenis bakteri saja.

Pada pengamatan hari ke-21 Vibrio hanya ditemukan pada K- , hal ini menunjukkan bahwa probiotik yang diberikan mempengaruhi komposisi bakteri Kerapu Macan menjadi lebih baik. Probiotik yang diberikan mampu merangsang per-tumbuhan bakteri-bakteri asam laktat untuk melawan pertumbuhan patogen pada usus Kerapu Macan. Pada pengamatan pada hari ke-28 komposisi bakteri pada perlakuan K+, A, B, dan C didominasi oleh bakteri *Bacillus* sp.

**Kelimpahan Bakteri Asam Laktat**

Pada pengamatan hari ke-0 berdasarkan uji statistik diketahui kelimpahan bakteri asam laktat tidak berbeda nyata pada semua perlakuan. Pengamatan ini dilakukan sebelum pemberian perlakuan, hal ini menunjukkan bahwa pada kondisi awal keberadaan bakteri asam laktat pada tiap sampel ikan uji pada semua perlakuan sama.

Ket : K- (Pemberian pakan tanpa penambahan probiotik); K+ (Pemberian pakan dengan

probiotik tanpa mikrokapsul); A (Pemberian pakan dengan mikrokapsul probiotik dosis 1g/kg pakan); B (Pemberian pakan dengan mikrokapsul probiotik dosis 2g/kg pakan); C (Pemberian pakan dengan mikrokapsul probiotik dosis 3g/kg pakan)

Gambar 1. Kelimpahan Bakteri Asam Laktat

Pemberian probiotik yang dimikrokapsul maupun tidak dimikrokapsul mampu meningkatkan kelimpahan bakteri asam laktat. Pemberian dosis 3 g/kg pakan merupakan dosis probiotik tertinggi yang mempengaruhi kelimpahan bakteri asam laktat. Bakteri asam laktat (BAL) adalah bakteri yang paling banyak digunakan sebagai probiotik. Salah satu kemampuan bakteri asam laktat ialah membentuk flora normal yang seimbang (Vazquez et al., 2005). Bakteri asam laktat dan bakteri lain dari usus berperan pada sistem pertahanan pertama terhadap kolonisasi dan pelekatan bakteri patogen pada saluran pencernaan ikan (Ringo et al. 2003).

**Kelimpahan *Bacillus* sp. D2.2**

Penggunaan Bakteri *Bacillus* sp. D2.2 sebagai probiotik karena isolat bakteri *Bacillus* sp. D2.2 mampu menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi, Stapylococcus aureus* dan *Aeromonas hydrophila* secara in vitro (Aji, 2014).

Ket : K+ (Pemberian pakan dengan probiotik tanpa mikrokapsul); A (Pemberian pakan dengan mikrokapsul pro-biotik dosis 1g/kg pakan); B (Pemberian pakan dengan mikrokapsul probiotik dosis 2g/kg pakan); C (Pemberian pakan dengan mikrokapsul probiotik dosis 3g/kg pakan)

Gambar 2. Kelimpahan *Bacillus* sp. D2.2

Perlakuan mikrokapsul probiotik dengan dosis 3 g/kg pakan mampu meningkat-kan kelimpahan *Bacillus* sp. D2.2 dibandingkan kontrol positif. Dari grafik di atas diketahui bahwa kelimpahan *Bacillus* sp. D2.2 dengan dosis yang berbeda me-nunjukkan hasil yang tidak signifikan hal ini disebabkan karena kemampuan usus untuk menampung bakteri. Menurut Rahayu *et al*., (1992), menyatakan bahwa jumlah bakteri pada ikan berkisar antara 102 sampai 106 per cm2 pada kulit, 103 sampai 105 per gram di dalam insang dan sampai 107 per gram di dalam usus.

**KESIMPULAN**

Terdapat pengaruh pemberian mikrokapsul probiotik terhadap komposisi bakteri pada usus Kerapu Macan. Mikrokapsul probiotik mampu mempengaruhi viabilitas bakteri probiotik dan kelimpahan bakteri asam laktat.

**DAFTAR PUSTAKA**

Aji, M.B. (2014). Aktifitas senyawa antimikroba dari bakteri biokontrol D2.2

 terhadap bakteri patogen pada udang dan ikan secara in vitro. *Skripsi*. Bandar Lampung: Universitas Lampung

Barrow, G.I., & Feltham, R.K.A. (2003). *Cowan and steel’s manual for the identification of medical bacteria*. (3rd ed.). Cambridge : Cambridge University Press.

Esteve, C., Amaro, C., Biosca, E. G., & Garay, E. (1995). Biochemical and toxigenic properties of *Vibrio furnissii* isolated from a European sel farm. *Aquaculture*. 132(1-2): 81-90.

Irianto, K. (2007). *Mikrobiologi menguak dunia mikroorganisme Jilid 1*. Bandung: CV. Yrama Widya

Jimoh, W. A., Oladele-Bukola, M. O., Adebayo, M. D., Yusuff, A. A., Azeez, F. A., & Salami, O. O. (2014). Microbial flora of the gastro-intestinal tract of *Clarias gariepinus* caught from river Dandaru Ibadan, Nigeria. *Sokoto Journal of Veterinary Sciences*. 12(2): 19-24.

Kone, K., & Fung, D. Y. C. (1990). Understanding bacteriocins and their uses in foods. *Dairy food and environmental sanitation*. 12 : 282-285

Mahdhi, A., Kamoun, F., Messina, C., & Bakhrouf, A. (2012). Probiotic properties of *Bacillus brevis* and its influence on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval rearing. *African Journal of Microbiology Research*. 6(35): 6487-6495.

Noguchi, T., Hwang, D. F., Arakawa, O., Sugita, H., Deguchi, Y., Shida, Y., & Hashimoto, K. (1987). *Vibrio alginolyticus*, a tetrodotoxin-producing bacterium, in the intestines of the fish Fugu *vermicularis vermicularis*. *Marine Biology*. 94(4):625-630.

Putra, A. N., & Utomo, N. B. P. (2015). Growth performance of tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed with probiotic, prebiotic and synbiotic in diet. *Pakistan Journal of Nutrition*. 14(5): 263-268.

Rahayu, W.P., Ma’oen, Suliantari, & Fardiaz. (1992). *Teknologi fermentasi produk perikanan*. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Bogor: PAU Pangan dan Gizi. IPB.

Ringo, E., Olsen, R. E., Mayhew, T. M., & Myklebust, R. (2003). Electron microscopy of the intestinal microflora of fish. *Aquaculture*. 227(1-4): 395-415.

Soesanto, L. (2008*). Pengantar pengendalian hayati penyakit tanaman, suplemen ke gulma dan nematoda*. Jakarta: PT Raja Grafindo Persada.

Subagiyo & Djunaedi, A. (2011). Screening of candidate probiotic bacteria from the digestive tract groupers based anti-bacterial activity and production of extracellular proteolytic enzymes. *Journal Marine Science*. 16: 41-48.

Sumanti, D.M., Lanti, I., Hanidah, I., Sukarminah, E. & Giovanni, A., (2016) . Pengaruh konsentrasi susu skim dan maltodekstrin sebagai penyalut terhadap viabilitas dan karakteristik mikroenkapsulasi suspensi bakteri *Lactobacillus plantarum* menggunakan metode *freeze drying*. *Jurnal Penelitian Pangan*. 1(1): 2-6.

Sumanti, D.M., Lanti, I., Hanidah, I., Sukarminah, E. & Giovanni, A., (2016) . Pengaruh konsentrasi susu skim dan maltodekstrin sebagai penyalut terhadap viabilitas dan karakteristik mikroenkapsulasi suspensi bakteri *Lactobacillus plantarum* menggunakan metode *freeze drying*. *Jurnal Penelitian Pangan*. 1(1): 2-6.

Triana, E., Yulianto, E., & Nurhidayat, N. (2006). Uji viabilitas *Lactobacillus* sp. terenkapsulasi. *Biodiversitas*. 7(2): 114-117.

Vazquez, J. A., González, M., & Murado, M. A. (2005). Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture*. 245(1-4): 149-161.