

Isolasi bakteri probiotik *Lactobacillus* sp dari usus ikan mas (*Cyprinus carpio*)  
(Isolation of probiotic bacteria *Lactobacillus* sp from intestine of carp, *Cyprinus carpio*)

**Intan Alam Novitarizky<sup>1</sup>, Henky Manoppo<sup>2</sup>, Sammy N.J. Longdong<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>) Mahasiswa Program Studi Budidaya Perairan FPIK UNSRAT Manado

<sup>2</sup>) Staf Pengajar Pada Program Studi Budidaya Perairan FPIK UNSRAT Manado

Email: intan.alam16@gmail.com

### **Abstract**

The objective of research was to isolate the probiotic bacteria from intestine of carp. Isolation was performed by weighing 1 g of intestine, crushed and inserted in a reaction tube containing 9 mL of NaCl then centrifuged. Supernatant was taken and spread over the agar medium by scatter method. The bacteria-stocked medium was then incubated in an incubator at 28°C for 24-48 hours. The growing colonies were re-isolated on the agar medium to obtain pure colonies. The bacteria were then identified by morphological observation, resulting pigment and gram staining. Five Nile tilapia (sized 8 – 10 cm) were used in pathogenicity test and placed in the aquarium. Fish were injected with 0.2 ml of *Lactobacillus* solution containing  $1 \times 10^7$  CFU/mL via intraperitoneal injection. The results showed that the bacteria *Lactobacillus* sp had rod-shaped characteristics, white pigment and gram positive and not pathogenic, which means it can be used as probiotic for aquaculture.

**Keywords :** *Lactobacillus* sp, carp, probiotic, pathogenicity test.

### **PENDAHULUAN**

Dalam budidaya intensif ikan sering dipelihara dengan kepadatan tinggi dalam ruang terbatas yang bertujuan untuk menghasilkan produksi yang tinggi. Salah satu masalah yang sering dihadapi dalam intensifikasi usaha adalah terjadinya serangan penyakit yang berkepanjangan dan membutuhkan kontrol terhadap penyebab penyakit tersebut. Penyakit ikan dapat disebabkan oleh berbagai organisme patogen seperti bakteri, virus, jamur dan parasite (Noga, 2010; Woo and Bruno,

2011). Berbagai metode penanggulangan penyakit ikan telah dilakukan dan terus berkembang. Metode pencegahan penyakit yang sering digunakan adalah dengan menggunakan antibiotik atau bahan kimia, vaksinasi, imunostimulan serta penggunaan berbagai tanaman obat maupun probiotik. Meskipun pemberian antibiotik dan kemoterapi efektif untuk mencegah atau melindungi ikan dari penyakit, namun penggunaannya perlu dipertimbangkan karena adanya residu antibiotik dan bahan-bahan kimia yang menyebabkan mikroorganisme kebal antibiotik (Antibiotic

Resistant Microorganism, ARM). Kondisi yang resisten mengkhawatirkan manusia sebagai konsumen produk hasil budidaya. Untuk itu berbagai usaha penanggulangan penyakit yang aman perlu dikembangkan agar kita dapat mengkonsumsi produk hasil budidaya yang sehat (Hagi *and* Hashino, 2009). Tanaman obat sudah banyak digunakan dalam kontrol penyakit karena mengandung bahan-bahan antimikroba maupun bahan bioaktif lainnya seperti jahe mampu mengontrol *Aeromonas hydrophilla*, berfungsi sebagai imunostimulan yang meningkatkan kekebalan tubuh serta pertumbuhan ikan (Nya *and* Austin, 2009; Payung *et al.*, 2017; Payung *dan* Manoppo, 2015). Bawang putih telah dilaporkan berfungsi sebagai promotor pertumbuhan pada ikan mas (Manoppo *et al.*, 2016). Ekstrak kemangi (*Ocimum sactum*) telah dilaporkan mampu menghambat patogen *Aeromonas hydrophylla* (Sambuaga *dkk*, 2018). Penggunaan imunostimulan seperti ragi roti dan nukleotida telah dilaporkan efektif meningkatkan sistem kekebalan tubuh dan pertumbuhan ikan maupun udang (Manoppo, 2011; Manoppo *et al.*, 2015) Penggunaan probiotik dalam akuakultur merupakan alternatif yang sangat baik dalam mencegah penyakit infeksi untuk mengganti penggunaan antibiotik dan bahan-bahan kimia (Hagi *and* Hashino, 2009).

Probiotik adalah mikroorganisme yang hidup dengan cara memperbaiki keseimbangan mikroba usus dan juga sebagai penyiapan sel mikroba atau komponen sel mikroba yang memiliki pengaruh menguntungkan pada kesehatan inang (Sornplang *and* Sudthidol, 2016). Penggunaan probiotik pada usaha budidaya

ikan atau udang dapat mengurangi penggunaan antibiotik, berpengaruh nyata terhadap kelangsungan hidup, pertumbuhan dan produksi. Hal ini akan menjadi pertimbangan bahwa penggunaan bakteri yang menguntungkan mampu melakukan kompetisi terhadap pathogen yang potensial menginfeksi dalam pemeliharaan udang, sehingga akan meniadakan ketergantungan penggunaan antibiotik dan bahan kimia lain (Sornplang *and* Sudthidol, 2016).

Probiotik telah didefinisikan oleh para peneliti dengan cara yang berbeda dikaitkan dengan pemeliharaan hewan, manusia dan akuakultur. Probiotik merupakan mikroorganisme hidup yang apabila diberikan pada hewan, manusia atau ikan akan mempengaruhi inang dengan cara memperbaiki properti mikroflora indigenous dari inang atau lingkungan (Kolndadacha *et al.*, 2013). FAO/WHO mendefinisikan probiotik sebagai mikroorganisme hidup yang dapat memperbaiki kesehatan manusia dan hewan serta harus aman dan dalam jumlah yang cukup untuk fungsi tubuh (Sornplang *and* Sudthidol, 2016).

Selama 10 tahun terakhir mikroorganisme probiotik sudah digunakan secara berkelanjutan untuk meningkatkan kesehatan ikan dan manusia. Hal ini disebabkan karena probiotik merupakan alternatif terhadap penggunaan antibiotik seperti menurunkan mikroorganisme yang kebal terhadap antibiotik akibat penggunaan antibiotik yang terus menerus dalam pencegahan ataupun pengobatan penyakit infeksi pada ikan (Sornplang, 2016). Bakteri probiotik memperbaiki kesehatan ikan dengan mengontrol patogen dan memperbaiki kualitas air dengan cara

mengatur dan memodifikasi komposisi komunitas mikroba air. Bakteri probiotik masuk dalam usus atau melekat pada permukaan luar tubuh baik langsung dari air atau melekat lebih dahulu pada makanan atau partikel-partikel makanan yang dicerna. Karena penyakit merupakan suatu interaksi yang kompleks antara inang, patogen dan lingkungan sehingga selalu diperhadapkan dengan antimikroba, desinfektan dan kemoterapi yang tidak dapat dipecahkan secara memuaskan. Usaha untuk mengeksplorasi kontrol alternatif seperti probiotik perlu diupayakan. Dengan demikian tujuan utama penggunaan probiotik adalah untuk mempertahankan atau memulihkan hubungan yang serasi antara mikroorganisme patogenik yang merupakan bagian flora intestin atau lendir pada kulit organisme akuatik (Pannu *et al.*, 2014).

## METODE PENELITIAN

### Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kesehatan Ikan, Lingkungan dan Toksikologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam Ratulangi Manado. Penelitian berlangsung dari tanggal 10 Agustus 2017 sampai dengan 18 September 2017.

### Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan yaitu Ikan mas, alkohol, aquadest, NaCl, MRS Agar, aluminium foil. Sedangkan alat yaitu timbangan, autoclave, bunsen, laminar flow, cawan petri, botol schott, gelas ukur, sendok, tabung reaksi, kawat ose, batang L, pinset, gunting bedah, mortar, baki,

inkubator, kaca preparat, jarum suntik, mikroskop, sentrifus, akuarium.

### Pembuatan Media Agar

Tahap awal dalam pembuatan media agar adalah menyiapkan semua alat dan bahan yang digunakan seperti cawan petri, botol schot. Selanjutnya, media selektif MRS ditimbang 3,8 gr dan larutkan secara merata dalam 63 ml aquadest yang ditempatkan dalam botol schot dan dididihkan di atas api bunsen. Setelah mendidih, media diangkat dan dimasukkan dalam autoclave untuk disterilkan. Bersamaan dengan itu, peralatan lain seperti cawan petri, kawat ose, gelas ukur juga dimasukkan setelah dibungkus dengan aluminium foil. Sterilisasi dilakukan dalam autoclave NB-1100 pada suhu 121<sup>0</sup>C selama kurang lebih 30 menit.

Setelah selesai, Media Agar MRS dan alat-alat tersebut diangkat dan di letakkan di laminar flow. Setelah cawan petri kering, media agar dituang ke masing-masing petri dengan ketebalan 5-6 mm kemudian dibiarkan sesaat dalam laminar flow sampai tidak terdapat lagi sisa-sisa uap air. Media yang sudah mengeras dan kering sudah dapat digunakan untuk kultur bakteri. Media yang belum digunakan ditutup rapat dengan selotip dan disimpan di lemari pendingin.

### Isolasi Bakteri

Ikan mas dibedah menggunakan gunting bedah, pinset dan isi perut dikeluarkan selanjutnya usus dipisahkan dan diambil sebanyak 1 g, digerus dengan menggunakan mortar kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi (wadah) berisi 9 ml NaCl. Tabung dikocok dengan perlahan

agar suspensi dari usus tersebar merata, kemudian larutan disentrifuge selama 10 menit. Supernatan dikeluarkan dan dimasukkan dalam tabung reaksi. Supernatan diencerkan sampai pada kepadatan  $10^{-2}$  -  $10^{-4}$  lalu inokulum disebar pada permukaan media agar dengan metode tuang dan gores. Metode tuang dilakukan dengan cara mengambil 1 mL supernatan dan langsung tuang pada permukaan agar. Untuk membantu agar supernatan tersebar merata maka digunakan batang L. Metode gores dilakukan dengan cara mencelupkan kawat ose pada supernatan lalu digores pada permukaan media agar secara zigzag. Media kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu  $28^{\circ}\text{C}$  selama 24-48 jam. Selanjutnya koloni bakteri yang tumbuh diamati karakteristiknya seperti bentuk koloni dan warna pigmen. Setelah itu, setiap koloni bakteri yang berbeda dimurnikan dengan cara mengkultur kembali pada media yang sama untuk mendapatkan koloni tunggal (Mulyasari *et al.*, 2016).

### Identifikasi Bakteri

Untuk identifikasi bakteri maka dilakukan Pewarnaan Gram terhadap bakteri yang sudah dimurnikan. Pertama dibuat preparat ulas dengan cara : bakteri yang sudah murni diambil dengan kawat ose dan disuspensikan dengan sedikit aquadest dalam tabung reaksi. Selanjutnya dilakukan pewarnaan dengan prosedur sebagai berikut (Anonim, 2007)

1. Jarum ose dipijarkan kemudian ditunggu hingga dingin, lalu bakteri diambil dari media lalu diratakan di atas kaca preparat.
2. Kaca preparat didiamkan sampai kering.

3. Larutkan zat warna krista violet dan diteteskan sebanyak 2-3 tetes dan diamkan selama 1 menit.
4. Preparat dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan.
5. Larutan lugol diteteskan 2-3 tetes dan dibiarkan selama 1 menit lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan.
6. Cuci dengan alkohol 95% diberikan selama 30 detik, lalu dicuci lagi dengan air mengalir dan dikeringkan.
7. Teteskan larutan safranin 2-3 tetes dan diamkan selama 20 detik.
8. Cuci dengan air mengalir dan dikeringkan kembali.
9. Hasil pewarnaan diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 40-100x.

### Uji Patogenitas

Uji patogenitas dilakukan untuk memastikan apakah kandidat bakteri probiotik yang diisolasi bersifat patogen atau tidak pada ikan (Marlida *et al.*, 2014). Uji patogenitas dilakukan dengan cara menyuntikkan larutan bakteri hasil isolasi pada ikan nila :

1. Ambil bakteri hasil kultur dengan kawat ose dan suspensikan dalam larutan NaCl dalam tabung reaksi sampai kekeruhan tertentu (tidak tembus pandang) dimana kepadatannya setara dengan  $1 \times 10^9$  cfu/mL.
2. Konsentrasi bakteri diencerkan untuk mendapatkan kepadatan  $1 \times 10^7$  cfu/mL.
3. Suntikkan 0,2 mL larutan bakteri yang mengandung kepadatan  $1 \times 10^7$  cfu/mL pada 5 ekor ikan secara intraperitoneal (IP).
4. Ikan dikembalikan di akuarium dan diamati mortalitasnya selama 7 hari.

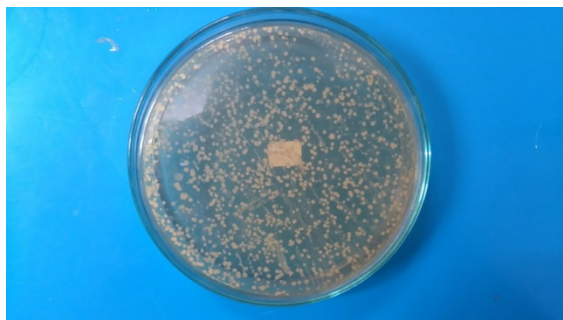
## Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dengan menggunakan rangkaian kata-kata, gambar, tabel terhadap hasil pengamatan

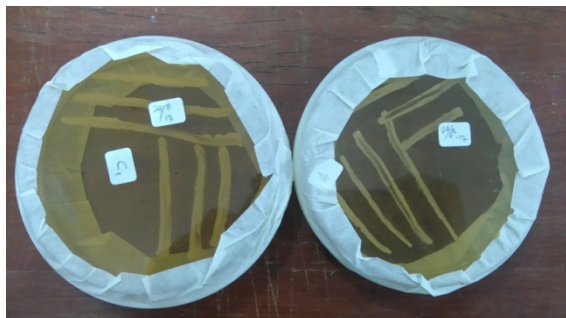
## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Karakteristik Bakteri

Hasil pengamatan terhadap bakteri yang tumbuh pada isolasi bakteri *Lactobacillus* dari usus ikan mas hanya terdiri dari 1 spesies. Dalam pengamatan, koloni yang tumbuh pada media yang dikultur dengan metode sebar berbentuk bulat dan menyebar dengan warna pigmen putih susu (Gambar 1). Koloni yang tumbuh pada media yang dikultur dengan metode gores dengan kawat ose berbentuk bulat tetapi menyambung mengikuti garis goresan dengan warna pigmen yang sama yaitu putih susu (Gambar 2).



Gambar 1. Koloni bakteri *Lactobacillus* sp pada media MRS

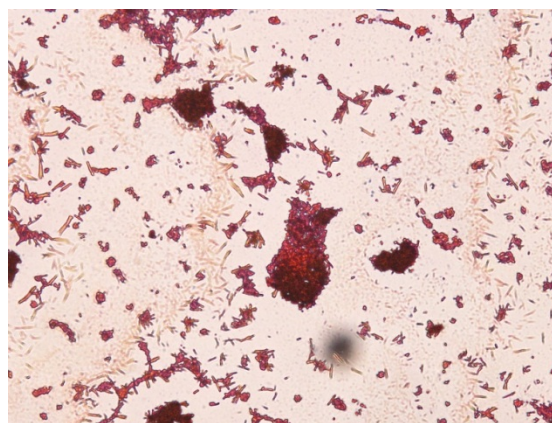


Gambar 2. Koloni bakteri *Lactobacillus* sp pada media MRS

Karakteristik bakteri *Lactobacillus* yang teramati serupa dengan yang dilaporkan oleh Gobinath and Ramanibai (2012) yang diisolasi dari ginjal, daging dan usus ikan nila menggunakan media MRS dimana bakteri *Lactobacillus* yang ditemukan secara morfologi yang memiliki karakteristik gram positif, rod-shape, non-motil, pada media agar memperlihatkan warna putih susu (white smooth) dan koloni tidak teratur.

### Identifikasi Bakteri

Hasil pengamatan terhadap bakteri *Lactobacillus* yang di isolasi dari usus ikan mas diidentifikasi melalui pewarnaan gram. Hasil pewarnaan gram memperlihatkan koloni berwarna ungu yang mengindikasikan gram positif (Gambar 3). Dalam praktek ini belum dilakukan uji biokimia untuk penentuan spesies yang ditemukan. Berdasarkan karakteristik morfologi yang teramati diduga bakteri yang ditemukan adalah *Lactobacillus acidophilus*.



Gambar 3. Hasil pewarnaan gram bakteri dengan warna ungu yang mengindikasikan gram positif

### Uji Patogenitas

Ikan yang digunakan untuk uji patogenitas adalah ikan nila sebanyak 5 ekor yang ditempatkan dalam akuarium. Ikan yang digunakan berukuran 8 – 10 cm. Ikan dalam akuarium disuntik dengan 0,2 ml larutan *Lactobacillus* mengandung  $1 \times 10^7$  CFU/mL melalui injeksi intraperitoneal. Hasil ujiantang memperlihatkan bahwa pada ikan yang disuntik dengan larutan *Lactobacillus*  $1 \times 10^7$  CFU/mL, tidak terjadi kematian sejak hari pertama sampai hari ke tujuh sesudah ujiantang.

Hasil uji di atas menunjukkan bahwa pada konsentrasi  $1 \times 10^7$  CFU/mL bakteri *Lactobacillus* sp hasil isolasi tidak bersifat patogenis yang artinya dapat digunakan. Bakteri ini efektif bekerja sebagai probiotik apabila diberikan dengan kepadatan yang lebih rendah dimana tidak terjadi kematian yang diujicobakan. Pada penelitian yang dilakukan oleh Marlida *et al.* (2014), uji patogenitas bakteri probiotik yang diisolasi dari ikan Humback Grouper (*Cromileptes altivelis*) dilakukan dengan cara menyuntikkan 1 mL larutan bakteri mengandung  $1 \times 10^6$  CFU/mL dimana hasil yang didapatkan tidak terjadi kematian.

Probiotik *Lactobacillus* sangat menguntungkan dalam kontrol penyakit sebagai probiotik dalam sistem imun dan pertumbuhan. Dalam penelitian yang dilakukan oleh Gobinath and Ramanibai (2012), pemberian *Lactobacillus* secara nyata meningkatkan pertumbuhan ikan nila dibandingkan dengan ikan kontrol yang tidak diberi *Lactobacillus*, sehingga bakteri ini dapat digunakan secara efektif sebagai probiotik di akuakultur.

Uji antagonistik yang dilakukan oleh Gobinath and Ramanibai (2012) menggunakan standar bakteri yang diencerkan pada  $10^4 - 10^5$  pada tube steril kemudian ditebar pada cawan petri yang berisi agar. Hasil uji antagonistik terhadap beberapa jenis bakteri (*Aeromonas* sp, *Vibrio* sp, *E.coli*, *Pseudomonas* sp, *Salmonella shigella*) ditemukan bahwa *Lactobacillus* dapat menghambat pertumbuhan *Aeromonas* sp, *Vibrio* sp dan *E.coli* yang ditunjukkan dengan zona hambat. (Gobinath and Ramanibai, 2012). Dalam penelitian yang dilakukan oleh Hagi and Hashino (2009), *Lactobacillus* yang diisolasi dari usus ikan mas terdiri dari *Lactobacillus lactis* dan *Lactobacillus raffinolactis* ditemukan yang memiliki aktivitas anti bakterial yang tinggi terhadap patogen ikan (*Aeromonas* sp). Selanjutnya Hagi and Hashino (2009) mendapatkan bahwa *Lactobacillus* dapat tumbuh pada kisaran temperatur yang tinggi ( $10-37$  °C) namun pertumbuhan terbaik ditemukan pada temperature  $25-30$  °C.

*Lactobacillus* juga dapat diterapkan dalam budidaya udang. Dalam penelitian yang dilakukan oleh Karthik *et al.* (2014) udang windu yang diberikan perlakuan *Lactobacillus* sp dan diuji tantang dengan *Vibrio harveyi* memiliki mortalitas 6% sedangkan udang yang tidak diberi perlakuan memiliki mortalitas 80%. Pada udang vanname, mortalitas sebesar 12% yang diberikan perlakuan *Lactobacillus* sp sedangkan udang yang tidak diberi perlakuan mortalitasnya mencapai 100%.

Dalam penelitian ini bakteri hasil isolasi adalah *Lactobacillus* sp dimana bakteri ini hanya tumbuh pada media

selektif. Untuk memastikan bahwa bakteri *Lactobacillus* sp yang diisolasi dari usus ikan mas yang digunakan dalam penelitian ini bersifat probiotik atau tidak maka dibutuhkan beberapa uji sebagai konfirmasi terhadap pemenuhan kriteria probiotik. Dalam penelitian ini, uji yang dilakukan hanya terbatas pada karakteristik bakteri melalui pengamatan morfologi dengan bantuan mikroskop, pewarnaan gram dan uji patogenitas.

### KESIMPULAN

1. Hasil isolasi mendapatkan satu jenis *Lactobacillus* sp dengan karakteristik berbentuk batang, gram positif dan memproduksi pigmen berwarna putih susu.
2. Hasil uji patogenitas memperlihatkan bahwa bakteri *Lactobacillus* sp hasil isolasi tidak bersifat patogen pada ikan yang berarti dapat digunakan sebagai probiotik dalam budidaya ikan.

### DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2017. Gram Strain Technique. <http://vlab.amrita.edu/?sub=3&brch=73&sim=208&cnt=2>. Diakses pada 15 September 2017.
- Arief M, Fitriani N, Subekti S. 2014. Pengaruh Pemberian Probiotik Berbeda pada Pakan Komersil Terhadap Pertumbuhan dan Efisiensi Pakan Ikan Lele Sangkuriang (*Clarias* sp.). Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan Vol. 6 No 1. 49-53
- Fuller R. 1989. A Review, Probiotics in Man and Animals. Journal of Applied Bacteriology, 66:365- 378.
- Gobinath J, Ramanibai R. 2012. Effect of Probiotic Bacteria Culture on Pathogenic Bacteria From Fresh Water Fish *Oreochromis mossambicus*. Journal of Modern Biotechnology Vol. 1, No.1 :50-54.
- Hadi JA. 2012. Use of Probiotic to Improve the Growth of Farmed New Zealand Abalone (*Haliotis iris*). Thesis Auckland University of Technology. New Zealand.
- Hagi T, Hoshino T. 2009. Screening and Characterization of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria from Cultured Common Carp Intestine. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 73(7) :1479-1483.
- Karthik R, Hussain AJ, Muthezhilan R. 2014. Effectiveness of *Lactobacillus* sp (AMET1506) as Probiotic against Vibriosis in *Penaeus monodon* and *Litopenaeus vannamei* Shrimp Aquaculture. Bioscience Biotechnology Research Asia Vol. 11(1) : 297-305.
- Kolndadacha OD, Adikwu IA, Orgem CM, Atiribom RY, Badmus O. 2013. The Potential probiotic bacteria associated with catfish (*Clarias angularis* and *Heterobranchus bidorsalis*) in concrete tanks in Kanji Lake area. International Journal of Microbiology and Immunology Research Vol 2(3) :024-028.
- Manoppo H. 2011. Peran nukleotida sebagai imunostimulan terhadap respon imun nonspesifik dan resistensi udang vanname (*Litopenaeus vannamei*). Disertasi. Institut Pertanian Bogor, Bogor.

- Manoppo H, Manurung UN, Tumbol RA. 2015. Efficacy of baker's yeast as immunostimulant in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). International Journal of ChemTech Research Vol.8, No.2: 559-565.
- Manoppo H, Kolopita MEF, Malatunduh R. 2016. Growth promoter effect of garlic (*Allium sativum*) on carp (*Cyprinus carpio* L). International Journal of PharmTech Research Vol.9, No.4: 283-288.
- Mulyasari, Widanarni, Suprayudi A, Zairin Jr, Sunarno MTD. 2016. Screening of Probiotics From the digestive tract of gouramy (*Osphronemus goramy*) and their potency to enhance the growth of tilapia (*Oreochromis niloticus*). Jurnal Bioflux Vol.9, No.5: 1121-1132.
- Noga EJ. 2010. Fish Disease : Diagnosis and Treatment. Second Edition. John Wiley and Sons, Inc. USA.
- Nya EJ, Austin B. 2009. Use of dietary ginger. *Zingiber officinale* Roscoe, as an immunostimulant to control *Aeromonas hydrophila* infections in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Diseases 32:971-977.
- Marlida R, Suprayudi MA, Widanarni, Harris E. 2014. Isolation, Selection and Application of Probiotic Bacteria for Improvement the Growth Performance of Humpback Groupers (*Cromileptes altivelis*). International Journal of Science : Basic and Applied Research (IJSBAR) Vol. 16, No. 1: 364-379.
- Pannu R, Dahiya S, Sabhlok VP, Kumar D, Sarsar V, Gahlawat SK. 2013. Effect of probiotic, antibiotics and herbal extracts against fish bacterial pathogens. Ecotoxicol. Environ. Contam. Vol.9(1): 13-20.
- Payung CN, Manoppo H. 2015. Peningkatan respon kebal non-spesifik dan pertumbuhan ikan nila (*Oreochromis niloticus*) melalui pemberian jahe, *Zingiber officinale*. Jurnal Budidaya Perairan Vol.3, No.1: 11-18.
- Payung CN, Tumbol RA, Manoppo H. 2017. Dietray ginger (*Zingiber officinale*) enhance resistance of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) against *Aeromonas hydrophila*. AACL Bioflux Vol. 10, Issue 4: 962-968.
- Sambuaga ME, Longdong SNJ, Manoppo H. 2018. Sensitivitas ekstrak tanaman kemangi (*Ocimum sanctum*) terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila*. Jurnal Budidaya Perairan Vol.6, No. 1: 1-7.
- Sornplang P, Sudthidol P. 2016. Probiotic isolates from unconventional sources. Journal of Animal Science and Technology 58:26.
- Woo PTK, Bruno DW. 2011. Fish Disease and Disorders : Viral, Bacterial, and Fungal Infections. Vol.3, Second Edition. CAB International, London.