

Uji aktivitas antagonistik *Lactobacillus* sp. yang diisolasi dari usus ikan betutu,
Oxyeleotris marmorata

(Antagonistic activity of *Lactobacillus* sp. isolated from intestine of
Oxyeleotris marmorata)

**Novelia M. A. Pangalila¹, Henky Manoppo², Robert A. Bara³, Rosita J. A. Lintang³,
Elvy L. Ginting³, Deiske A. Sumilat³**

¹ Mahasiswa Pascasarjana FPIK Unsrat Manado

² Staf Pengajar Program Studi Budidaya Perairan FPIK Unsrat Manado

³ Staf Pengajar Program Studi Magister Ilmu Kelautan FPIK Unsrat Manado

Penulis Korespondensi: N.M. Pangalila, novelia.map11@gmail.com

Abstract

This study was conducted to examine the antagonistic activity of probiotic bacteria isolated from the digestive tract of fish (*Oxyeleotris marmorata*). Fish having an average weight of 500 grams were obtained from fish ponds in Tetey Village, North Minahasa Regency. Fish were dissected, the intestine was separated from the other internal organs. The intestine was then weighed as much as 1 gram, cut into small pieces and then crushed using a mortar until smooth. The results of the scour were transferred to a test tube and 9 mL of NaCl solution was added, then centrifuged at 1000 RPM for 10 minutes for 2 times. The supernatant was diluted to obtain a concentration of 10^{-2} to 10^{-3} . The dilution was spread onto MRS media and incubated for 24-48 hours at 28°C. Growing colonies were cultured on MRS agar, purified and propagated. The pure isolate obtained were then subjected to Gram Stain, biochemical tests and antagonistic tests. The results of the study found that the characteristics of the bacteria were round shape, milky white in color, rod-shaped and Gram positive, and biochemically identified as *Lactobacillus* sp. These bacteria had strong antagonistic activity against *A. hydrophila* which was indicated by the presence of a clear zone with a diameter of 26.88 mm around the probiotic disc.

Keywords: probiotic, aquaculture, fish diseases, antibiotic

PENDAHULUAN

Usaha akuakultur merupakan usaha yang penerapannya dilakukan dengan campur tangan manusia untuk merekayasa reproduksi, pertumbuhan dan mortalitas. Perkembangan teknologi yang semakin maju memberikan pengaruh bagi usaha akuakultur, yang awalnya akuakultur sistem tradisional berkembang menjadi akuakultur

sistem intensif (Nasution dan Yanti, 2015). Pengaplikasian akuakultur sistem intensif yang memiliki kemajuan teknologi tidak serta-merta membuat sistem ini terhindar dari permasalahan. Masalah yang seringkali terjadi di lapangan biasanya disebabkan oleh kondisi lingkungan perairan menjadi buruk sampai meningkatnya penyakit, hingga akhirnya perekonomian di bidang industri

akuakultur merosot (Tan *et al.*, 2019; Xie *et al.*, 2019). Beragam metode diterapkan untuk menekan bahkan mengurangi permasalahan ini dengan cara mencegah dan mengontrol penyakit (Wang *et al.*, 2008). Metode yang umum digunakan untuk menanggulangi penyakit adalah dengan memakai antibiotik. Penerapan antibiotik cukup efektif untuk menekan dan membunuh patogen, namun memiliki resiko karena menyebabkan resistensi patogen jika digunakan secara terus-menerus (Babu *et al.*, 2013). Bahan kimia yang terkandung pada antibiotik tergolong tidak ramah terhadap lingkungan perairan, karena dapat meninggalkan residu pada tubuh ikan. Residu yang terakumulasi dalam tubuh ikan dapat membahayakan kesehatan manusia yang mengonsumsi (Wu *et al.*, 2013). Oleh karena itu diberlakukan protokol yang ketat untuk membatasi penggunaan antibiotik dalam akuakultur intensif (Hoseinefar *et al.*, 2018).

Pembatasan penggunaan antibiotik memunculkan inovasi terbaru untuk mendapatkan metode alternatif yang aman untuk penggunaan jangka panjang dan tidak membahayakan manusia yang mengonsumsi. Probiotik merupakan salah satu metode alternatif yang memberikan keuntungan dalam akuakultur (Wang *et al.*, 2008). Verschuer *et al.* (2000) menjelaskan alternatif penggunaan probiotik untuk mengganti pengobatan dengan antibiotik semakin banyak digunakan para petani. Kemudahan dalam pengaplikasian probiotik dan harga jual yang murah, membuat probiotik memiliki keterkaitan yang signifikan di industri akuakultur (Hoseinifar *et al.*, 2018). Probiotik terdiri dari kata “*pro*”

dan “*bios*” dalam bahasa Yunani yang memiliki arti “untuk kehidupan”. Definisi probiotik pertama kali didefinisikan oleh Parker tahun 1974, yaitu organisme atau substansi yang mempengaruhi pertumbuhan dan kelangsungan hidup mikroba di usus (Parker, 1974). Fuller (1989) menyatakan probiotik sebagai mikroba yang dikultur dan memiliki efek yang positif karena mempengaruhi inang dengan meningkatkan keseimbangan mikroba di dalam tubuh inang. Menurut Sornplang dan Piyadeatsoontorn (2016), probiotik berasal dari ragi dan bakteri yang pada saat digunakan tidak memiliki efek samping.

Penerapan probiotik dalam usaha akuakultur digunakan sebagai sarana meningkatkan sistem imun pada ikan, pengendalian kualitas air dan penyakit, pemberian nutrisi (Qi *et al.*, 2009; Undi *dkk.*, 2020; Pangalila *dkk.*, 2020). Keuntungan lain dari probiotik yaitu memproduksi enzim pencernaan seperti protease, amilase dan selulase yang mampu meningkatkan pertumbuhan inang (Bella *dkk.*, 2020; Mudeng *dkk.*, 2020; Kurniasih *et al.*, 2013). Hasil-hasil penelitian menunjukkan bahwa probiotik bisa diisolasi dari saluran pencernaan organisme akuatik seperti moluska *Anadara tuberculosa* (Sánchez-Ortiz *et al.*, 2015), udang *Litopenaeus vannamei* (Widanarni *et al.*, 2015), *Catla catla*, *Labeo rohita*, *Cirrhinus mrigala*, *Cyprinus carpio* (Muthukumar and Kandeepan, 2015), *Oreochromis niloticus* (Lara-Flores and Olvera-Novoa, 2013), *Channa striatus* (Allameh *et al.*, 2014). Penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan mikroba dari saluran pencernaan ikan betutu (*Oxyeleotris marmorata*) yang berpotensi

sebagai kandidat probiotik. Penyeleksiannya dengan berdasarkan fungsi probiotik di saluran pencernaan yang mampu melindungi ikan dari patogen melalui mekanisme senyawa antibakteri, dan bisa memproduksi enzim pencernaan yang berkontribusi terhadap proses pencernaan. Penelitian ini bertujuan mengisolasi bakteri probiotik dari usus ikan betutu dan menguji aktivitas antagonistik bakteri tersebut terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila*.

METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 5 bulan yakni Agustus - Desember 2021. Proses pengerjaan penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kesehatan Ikan, Lingkungan dan Toksikologi, dan Laboratorium Teknologi Akuakultur, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam Ratulangi.

Sumber probiotik

Bakteri probiotik diisolasi dari usus ikan betutu (*O. marmorata*) dengan berat rata-rata 500 gram. Ikan betutu tersebut ditangkap dari kolam ikan yang terletak di Desa Tetey, Kabupaten Minahasa Utara kemudian diangkut ke Laboratorium Kesehatan Ikan, Lingkungan dan Toksikologi, Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan Universitas Sam Ratulangi, Manado.

Isolasi dan Kultur Bakteri

Ikan yang diisolasi pertama-tama ditimbang berat badannya lalu disterilkan menggunakan tisu yang sudah dibasahi terlebih dahulu alkohol 70%. Alat-alat yang digunakan seperti pisau bedah, gunting,

pinset, baki, dan papan bedah disterilkan dengan alkohol 70%. Perut ikan dibedah dengan menggunting bagian perut dari arah anus memanjang sampai ke arah dada, kemudian dari dada dibuat potongan arah vertikal ke bagian punggung. Potongan dibuka dan organ diambil menggunakan pinset. Pemisahan usus dari organ dalam dilakukan di atas papan bedah. Isolasi bakteri dikerjakan menurut prosedur yang dikemukakan oleh Mulyasari *et al.* (2016). Usus ikan betutu ditimbang seberat 1 gram, dipotong beberapa bagian lalu dimasukkan ke dalam mortar untuk digerus sampai halus.

Hasil gerusan dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan larutan NaCl sebanyak 9 mL. Larutan NaCl yang sudah tercampur dengan hasil gerusan disentrifugasi pada kecepatan 1000 RPM selama 10 menit. Sentrifugasi dilakukan 2 kali untuk mendapatkan supernatan yang sudah terpisah dari debris. Supernatan yang selesai disentrifugasi memiliki konsentrasi 10^{-1} , diencerkan sampai 10^{-2} - 10^{-3} lalu disebar pada media MRS dan diinkubasi selama 24-48 jam dengan suhu 28 °C.

Bakteri yang telah tumbuh diisolasi kembali sampai pada media yang sama sampai didapatkan koloni tunggal dan murni. Jika sudah murni, bakteri diperbanyak untuk digunakan dalam penelitian.

Identifikasi Bakteri Probiotik

Identifikasi bakteri dilakukan melalui Metode pewarnaan gram, dan uji biokimia. Pewarnaan gram dikerjakan di Laboratorium Kesehatan Ikan, Lingkungan Dan Toksikologi Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan Unsrat sedangkan uji

biokimia dilakukan di Balai Karantina Kelas 1 Kota Manado.

Uji Antagonistik

Tujuan dari uji antagonistik adalah untuk mengetahui kemampuan kandidat bakteri probiotik dalam menghambat patogen. Patogen yang digunakan sebagai bahan uji yaitu bakteri *Aeromonas hydrophila*. Prosedur pengerjaan menurut Madigan *et al.* (1997) yaitu bakteri *A. hydrophila* diencerkan dengan kepadatan 10^5 CFU/mL, *A. hydrophila* disuspensikan sebanyak 0.1 mL lalu ditebarkan pada permukaan media agar TSA. Kertas cakram dicelupkan ke dalam tabung mikro yang sudah diisi dengan probiotik konsentrasi 10^{-7} lalu diletakkan di permukaan media agar. Media kemudian dinkubasi selama 24-48 jam dalam inkubator dengan suhu 28 °C. Kertas cakram lainnya dicelupkan ke dalam larutan fisiologis (NaCl) sebagai kontrol. Kemampuan kandidat bakteri sebagai probiotik dalam menghambat patogen ditandai dengan terbentuk zona hambat di sekitar kertas cakram.

Analisis Data

Data yang dikumpulkan dianalisis secara kuantitatif dan deskriptif kualitatif atau disebut dengan metode campuran (*mixed methods*) (Sugiyono, 2014). Analisis kuantitatif dilakukan dengan menggunakan statistik sederhana yaitu nilai rata-rata dan tabel. Analisis kualitatif dilakukan dengan menggunakan teks naratif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan Karakteristik Bakteri Probiotik

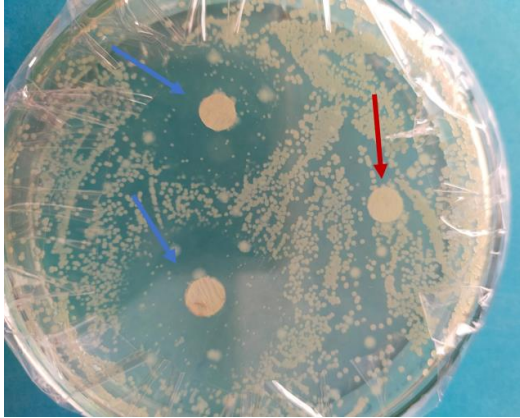
Hasil isolasi bakteri yang berasal dari usus ikan betutu (*O. marmorata*) dikultur menggunakan media selektif MRS, berhasil didapati bakteri dengan karakteristik koloni berbentuk bulat, serta berwarna putih susu dan berbentuk batang (rod-shaped). Uji biokimia mengidentifikasi bakteri tersebut sebagai *Lactobacillus* sp.

Hasil ini sejalan dengan laporan Gobinath dan Ramanibai (2012) dimana bakteri *Lactobacillus* sp. yang diisolasi dari usus, ginjal, dan daging ikan mujair yang dikultur dengan media MRS, memiliki ciri karakteristik Gram positif, rod-shaped, non motil, berwarna putih susu, dan koloni yang tidak beraturan. Laporan penelitian selanjutnya oleh Novitarizky *et al.* (2018) mendapatkan bakteri *Lactobacillus* sp. yang diisolasi dari usus ikan lele yang memiliki karakteristik berbentuk batang, non motil dan warna koloni putih susu. Dushku *et al.* (2019) juga mendapatkan bakteri asam laktat yang diisolasi dari siput (*Cornuaspersum maxima*) memiliki karakteristik bulat, putih keruh, rod-shaped.

Uji Antagonistik

Uji antagonistik dilakukan untuk memastikan jika *Lactobacillus* sp. memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen. Pada uji ini patogen yang digunakan adalah bakteri *Aeromonas hydrophila* yang merupakan penyebab penyakit MAS pada ikan-ikan air tawar dengan konsentrasi 10^5 CFU/mL. Hasil uji kandidat probiotik yang diisolasi dari ikan betutu bersifat antagonistik yang

ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambat di sekeliling kertas cakram yang memiliki kandungan *Lactobacillus* sp. dengan diameter rata-rata 26,88 mm (Gambar 1)



Gambar 1. Zona bening pada uji antagonistik (panah biru cakram probiotik, panah merah cakram kontrol)

Tabel 1. Aktivitas antagonistik *Lactobacillus* sp. terhadap *A. hydrophila*

Petri	Diameter Zona Bening (mm)
1	25,7
2	24
3	29,4
4	28,4
Rata-rata	26,88

Hasil penelitian ini sejalan dengan laporan penelitian Hagi and Hoshino (2009) yang mendapatkan bahwa *Lactobacillus lactis* dan *L. fuchuensis* yang diisolasi dari usus ikan mas dapat menghambat pertumbuhan *Aeromonas hydrophila* dengan zona hambat berdiameter 4 mm. Hal ini disebabkan dari produksi molekul antimikroba oleh probiotik seperti antibiotik, bakteriosin dan enzim litik untuk melawan kompetitornya. Manoppo *et al.* (2020)

melaporkan bahwa probiotik yang diisolasi dari usus ikan mas memiliki aktivitas antagonistic terhadap *A. hydrophila*. Mouriño *et al.* (2016) mengisolasi *Lactobacillus* sp. dari American catfish (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *Pseudoplatystoma corruscans*) memperlihatkan aktivitas antagonistik terhadap *A. hydrophilla* dengan diameter zona hambat 8,33-11,33 mm.

Beberapa hasil penelitian lain juga memperlihatkan kemampuan probiotik dalam menghambat mikroorganisme patogen. Pannu *et al.* (2014) mendapatkan bahwa penggunaan probiotik *Lactobacillus sporogenes* dapat menghambat bakteri Gram positif *Streptococcus aureus* dengan zona hambat sebesar 0.66 cm terhadap *K. neumoneae*. Penelitian Jang *et al.* (2019) menggunakan probiotik *L. plantarum* pada ikan olive flounder dalam menghambat *Streptococcus iniae* sehingga mampu meningkatkan kelangsungan hidup dibandingkan dengan ikan kontrol. Nguyen *et al.* (2017) mendapatkan *Lactobacillus lactis* yang telah diisolasi dari wild marine fish memiliki aktivitas yang kuat dalam menghambat bakteri Gram positif *S. iniae*. Kongnum and Hongpattarakere (2012) dimana probiotik *L. plantarum* yang diisolasi dari saluran pencernaan udang liar memberikan efek antagonistik terhadap bakteri *Vibrio harveyi*. Hasil penelitian Marlida *et al.* (2014) menunjukkan bahwa bakteri probiotik yang diisolasi dari usus ikan humpback grouper (*Cromileptes altivelis*) memiliki aktivitas antagonistik yang kuat terhadap patogen *Vibrio alginolyticus*. Karthik *et al.* (2014) mendapatkan *Lactobacillus* sp. yang

diisolasi dari Curd menggunakan media MRS lalu diberikan pada udang vaname dan udang *Penaeus monodon* selama 30 hari mampu menghambat bakteri *Vibrio* sp. penyebab penyakit vibriosis. Lin *et al.* (2019) mendapatkan penggunaan *Lactobacillus* spp. dapat menghambat penyakit enteritis, sehingga mampu meningkatkan kelangsungan hidup benih lined seahorse (*Hippocampus erectus*) dengan dosis terbaik yang diberikan yaitu 10-20 CFU/L selama 45 hari. Wang *et al.* (2019) mendapatkan *L. pentosus* dan *L. fermentum* secara nyata meningkatkan performa pertumbuhan dan resistensi penyakit sea bass (*Lates calcarifer*) dengan kepadatan probiotik 10⁹ CFU/kg pakan. Fečkaninová *et al.* (2017) berbagai properti mikroorganisme sebagai kandidat probiotik memiliki sifat non patogenik, tidak memiliki *plasmid-encoded antibiotic resistance genes* dan tahan terhadap asam lambung dengan pH yang rendah. Properti penting lainnya bersifat antagonistik terhadap patogen, mampu memproduksi enzim ekstraseluler yang memperbaiki pemanfaatan pakan.

KESIMPULAN

Bakteri yang diisolasi dari usus ikan betutu teridentifikasi sebagai *Lactobacillus* sp. dan memiliki sifat antagonistik yang kuat terhadap patogen *A. hydrophila* yang diindikasikan dengan terbentuknya zona bening di are sekitar cakram probiotik dengan diameter rata-rata mencapai 26,88 mm.

DAFTAR PUSTAKA

- Allameh SK, Ringø E, Yusoff FM, Daud, HM, Ideris A. 2014. Properties of *Enterococcus faecalis*, a new probiotic bacterium isolated from the intestine of snakehead fish (*Channa striatus* Bloch). African Journal of Microbiology Research 8(22): 2215-2222.
- Babu DT, Antony SP, Joseph SP, Bright AR, Philip, R. 2013. Marine yeast *Candidat aquatexloris* S527 as a potential immunostimulant black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Journal of Invertebrate Pathology 112 (3): 234-252.
- Bella SS, Manoppo H, Undap SL, Tumbol RA, Ngangi EL. 2020. Seleksi probiotik *Lactobacillus* sp. dari usus ikan mas (*Cyprinus carpio*) potensial untuk akuakultur. e-Journal Budidaya Perairan 8(2): 29-41.
- Dushku E, Ioannou A, Staikou A, Yiangou M. 2019. Probiotic properties and immunomodulatory activity of gastrointestinal tract commensal bacterial strains isolated from the edible farmed snail *Cornu aspersum maxima*. Fish & shellfish immunology 92: 792-801
- Fečkaninová A, Koščová J, Mudroňová D, Popelka P, Toropilova J. 2017. The use of probiotic bacteria against *Aeromonas* infections in salmonid aquaculture. Aquaculture 469: 1-8.
- Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology 66(5): 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 1(1): 50-54.
- 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.
- Hoseinifar SH, Sun YZ, Wang A, Zhou Z. 2018. Probiotics as means of disease control in aquaculture, a review of current knowledge and future perspectives. Frontiers in Microbiology 9: 2429
- Jang WJ, Lee JM, Hasan MT, Lee BJ, Lim SG, Kong IS. 2019. Effects of probiotic supplementation of a plant-based protein diet on intestinal microbial diversity, digestive enzyme activity, intestinal structure, and immunity in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Fish & shellfish immunology 92: 719-727.
- 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 11: 297-305.
- Kongnum K, Hongpattarakere T. 2012. Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi*. Fish & shellfish immunology 32(1): 170-177.
- Kurniasih T, Widanarni W, Mulyasari M, Melati I, Azwar ZI, Lusiastuti AM. 2013. Isolasi, seleksi, dan identifikasi bakteri dari saluran pencernaan ikan lele sebagai kandidat probiotik. Jurnal Riset Akuakultur 8(2): 277-286.
- Lara-Flores M, Olvera-Novoa MA. 2013. The use of lactic acid bacteria isolated from the intestinal tract of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*), as growth promoters in fish fed low protein diets. Latin American Journal of Aquatic Research 41(3): 490-497.
- Lin T, Liu X, Xiao D, Zhang D, Cai Y, Zhu X. 2019. *Lactobacillus* spp. as sprobiotics for prevention and treatment of enteritis in the lined seahorse (*Hippocampus erectus*) juveniles. Aquaculture 503:16-25.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 1997. Brock biology of microorganisms, 11. Upper Saddle River, NJ: Prentice hall.
- Manoppo H, Tumbol RA, Sumaraw J. 2020. Oral administration of probiotic improve survival of common carp (*Cyprinus carpio*) against *Aeromonas hydrophila* infection. Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation 13(6): 3377-3383.
- Marlida R, Suprayudi MA, Harris E. 2014. Growth, digestive enzyme activity and health status of humpback grouper (*Cromileptes altivelis*) fed with synbiotic. Pakistan Journal of Nutrition 13(6): 319-326.

- Mouriño JLP, do Vale Pereira G, do Nascimento Vieira F, Jatobá AB, Ushizima TT, da Silva BC, Seiffert WQ, Jesus GFA, Martins ML. 2016. Isolation of probiotic bacteria from the hybrid South American catfish *Pseudoplatystoma reticulatum* x *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae): A haematological approach. *Aquaculture Reports* 3: 166-171.
- Mudeng CC, Manoppo H, Lantu S, Kreckhoff RL, Tumbol RA. 2020. Suplementasi bakteri probiotik meningkatkan performa pertumbuhan dan efisiensi pakan benih ikan mas (*Cyprinus carpio*). *e-Journal Budidaya Perairan* 8(1): 8-18.
- Mulyasari, Widanarni, Suprayudi MA, Zairin Jr M, Mas T, Sunarno D. 2016. Screening of probiotics from the digestive tract of gouramy (*Osphronemus goramy*) and their potency to enhance the growth of tilapia (*Orochromis niloticus*). *Aquacultur, Aquarium, Conservation & Legislation* 9(5): 1121-1132.
- Muthukumar P, Kandeepan C. 2015. Isolation, identification and characterization of probiotic organisms from intestine of fresh water fishes. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 4(3): 607-616.
- Nasution Z, Yanti BVI. 2015. Adopsi teknologi budidaya udang secara intensif di kolam tambak. *Jurnal Kebijakan Sosial Ekonomi Kelautan Dan Perikanan*. 5(1): 1-9.
- Nguyen TL, Park CI, Kim DH. 2017. Improved growth rate and disease resistance in olive flounder, (*Paralichthys olivaceus*), by probiotic *Lactococcus lactis* WFLU12 isolated from wild marine fish. *Aquaculture* 471: 113-120.
- Novitarizky IA, Manoppo H, Longdong SN. 2018. Isolasi bakteri probiotik *Lactobacillus* sp. dari usus ikan mas (*Cyprinus carpio*). *e-Journal Budidaya Perairan* 6(2): 17-24.
- Pangalila N, Manoppo H, Tumbol RA, Lumenta C, Kreckhoff RL, Warouw V. 2020. Respon imun benih ikan mas, *Cyprinus carpio*, yang diberi pakan probiotik *Lactobacillus* sp. dengan konsentrasi berbeda. *e-Journal Budidaya Perairan* 8(1): 38-47.
- Pannu R, Dahiya S, Sabhlok VP, Kumar D, Sarsar V, Gahlawat SK. 2014. Effect of probiotics, antibiotics and herbal extracts against fish bacterial pathogens. *Ecotoxicology, environment, and Contamination* 9(1): 13-20.
- Parker RB. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Animal Nutrie Health* 29: 4-8.
- Qi Z, Zhang XH, Boon N, Bossier P. 2009. Probiotics in aquaculture of China- Current state, problems and prospect. *Aquaculture* 290(1-2): 15-21.
- Sánchez-Ortiz AC, Luna-González A, Campa-Córdova AI, Escamilla-Montes R, del Carmen Flores-Miranda M, Mazón-Suástegui JM. 2015. Isolation and characterization of potential probiotic bacteria from

- pustulose ark (*Anadara tuberculosa*) suitable for shrimp farming. Latin American Journal of Aquatic Research 43(1): 123-136.
- Sornplang P, Piyadeatsoontorn S. 2016. Probiotics isolates from unconventional sources: a review. Journal of Animal Science and Technology 58(11): 1-11.
- Sugiyono. 2014. Metode penelitian kombinasi (*mixed methods*), edisi ke-5. Bandung.
- Tan HY, Chen SW, Hu SY. 2019. Improvements in the growth performance, immunity, disease resistance, and gut microbiota by the probiotic *Rumeliibacillus stabekisii* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Fish and Shellfish 92: 265-275.
- Undi CS, Manoppo H, Kreckhoff RL, Tumbol RA, Pangkey H. 2020. Penggunaan probiotik untuk meningkatkan respon imun nonspesifik ikan mas (*Cyprinus carpio*). e-Journal Budidaya Perairan 8(2): 42-50.
- Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiology and Molecular Biology Reviews 64(4): 655-671.
- Wang YB, Li JR, Lin J. 2008. Probiotics in aquaculture: challenges and outlook. Aquaculture. 281(1-4): 1-4.
- Wang YC, Hu SY, Chiu CS, Liu CH. 2019. Multiple-strain probiotics appear to be more effective in improving the growth performance and health status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, than single probiotic strains. Fish & shellfish immunology 84: 1050-1058.
- Widanarni, Nopitawati T, Jusadi D. 2015. Screening of probiotic bacteria candidates from gastrointestinal tract of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* and their effects on the growth performances. Research Journal of Microbiology 10(4):145-157.
- Wu YR, Gong QF, Fang H, Liang WW, Chen M, He RJ. 2013 Effect of *Sophora flavescens* on non-specific immune response of tilapia GIFT (*Oreochromis niloticus*) and disease resistance against *Streptococcus agalactiae*. Fish and Shellfish Immunology 34(1) : 220-227.
- Xie JJ, Liu QQ, Liao S, Fang HH, Yin P, Xie SW, Tian LX, Liu JY, Niu J. 2019. Effects of dietary mixed probiotics on growth, non-specific immunity, intestinal morphology and microbiota of juvenile pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish and Shellfish Immunology 90: 456-465.