

ANTAGONIS BAKTERI PROBIOTIK YANG DIISOLASI DARI USUS DAN LAMBUNG IKAN KERAPU BEBEK (*CROMILEPTES ALTIVELIS*) TERHADAP BAKTERI PATOGEN

Feliatra¹⁾, Yuni Fitria¹⁾ dan Nursyirwani¹⁾

¹⁾Laboratorium Mikrobiologi Laut, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Riau

Diterima : 20 Februari 2012 Disetujui : 1 April 2012

ABSTRACT

Grouper fish has a fairly high economic value, especially in Asian countries, namely Hong Kong, Singapore, Taiwan and China. High market demand. On aquaculture, is one important component of fish feed that plays an important role in the cultivation. Application of probiotics in aquaculture fish feed has not been done yet in the Fisheries sector. The research was conducted in October 2008, Grouper is used as the intestines and stomach samples were taken as a source of probiotics, whereas pathogenic bacteria obtained from the collection of marine microbiology laboratory of Faculty of Fisheries and Marine Riau University. From the isolation of bacterial strains found 11 strains that have the potential as probiotics, then proceed to the molecular test by using rDNA16 s. Which is obtained two strains of probiotic bacteria *Bacillus cereus* and the species of bacteria *Strenotrophomonas maltophilia*. The test results found that the antagonist *Bacillus cereus* isolates to inhibit the growth of pathogenic bacteria *Aeromonas sp* and two species of *Vibrio sp*. While the bacteria *Strenotrophomonas maltophilia* showed no antagonism against pathogens.

Keywords : Antagonist, fish food, pathogen, probiotics

PENDAHULUAN

Pengembangan usaha budidaya laut di Indonesia untuk saat ini dan masa yang akan datang memegang peranan penting bagi perkembangan sektor perikanan ke depan, karena budidaya laut merupakan salah satu prioritas untuk pertumbuhan ekonomi perikanan. Salah satu produk unggulannya adalah ikan kerapu.

Ikan kerapu merupakan salah satu ikan yang memiliki ekonomis penting dan digemari sehingga tidak dapat dipenuhi oleh hasil tangkapan. Petani ikan di beberapa daerah sudah mulai gencar memelihara ikan kerapu dalam keramba apung atau tambak (Sugama et al 2001)

Keberhasilan pengembangan teknologi produksi budidaya massal benih ikan kerapu secara umum telah memberikan dampak yang positif terhadap perekonomian masyarakat, sehingga dapat meningkatkan penyerapan tenaga kerja

dan penghasilan petani ikan. Benih yang sudah banyak diproduksi adalah jenis kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*) dan kerapu lumpur (*Ephinepehelus coiiodes*) (Ismi, 2004)

Dalam proses pengembangan usaha pembenihan ikan kerapu, permasalahan yang selalu timbul adalah kualitas pakan yang diberikan, baik pada tingkat pembenihan maupun pada tahap pembesaran. Hal ini disebabkan karena belum teratasinya permasalahan pakan yang tidak saja menyebabkan lambatnya pertumbuhan ikan atau udang, pemborosan pakan serta ongkos produksi yang tinggi, namun juga menurunkan mutu komoditas sehingga harga ikan atau udang di pasaran menjadi rendah.

Probiotik merupakan pangan yang mengandung sejumlah bakteri yang memberikan efek yang menguntungkan kesehatan organisme, dengan memperbaiki keseimbangan mikroflora intestinal, sehingga dapat memberikan keuntungan perlindungan, proteksi penyakit, perbaikan daya cerna (Prangdimurti, 2001). Probiotik tergolong dalam makanan fungsional, dimana bahan makanan ini mengandung komponen-komponen yang dapat meningkatkan kesehatan ternak dan mengefesienkan pakan dengan cara manipulasi komposisi bakteri yang ada dalam pakan udang. Namun tidak semua bakteri yang berpotensi sebagai probiotik. Perlu adanya identifikasi secara genetik yang menunjukkan hasil identifikasi secara spesifik. Untuk itu perlu diketahui karakteristik molekuler bakteri probiotik yang terdapat pada udang windu, terutama dalam penemuan spesies baru atau galur bakteri lokal sehingga dapat memperkaya isolat bakteri asli Indonesia.

Penggunaan interaksi bakteri probiotik pada lingkungannya atau yang dikonversikan melalui pakan dan sengaja dimasukkan areal budidaya merupakan salah satu alternatif yang bisa digunakan. Kehadiran suatu spesies pada suatu lokasi atau ekosistem dapat memberikan keuntungan tertentu bagi spesies lain. Keuntungan tersebut dapat berupa perlindungan dari gangguan makhluk lain atau kondisi alam yang ekstrim. Suplai energi atau bahan makanan, membantu daya cerna usus dan bentuk keuntungan lainnya (Feliatra 2002)

Kehadiran jenis bakteri patogen seperti *Vibrio sp*, *Aeromonas sp*, *Pseudomonas sp* akan menyebabkan penyakit pada ikan budidaya, sehingga perlu diantisipasi untuk pencegahannya. Salah satu cara yang digunakan adalah menginteraksikan bakteri probiotik dengan pakan yang akan diberikan pada ikan budidaya.

Salah satu usaha yang dilakukan adalah untuk menentukan bakteri probiotik yang memiliki kadar antogonis terhadap bakteri patogen. Produk yang dihasilkan adalah toksin yang dihasilkan oleh bakteri probiotik tersebut sehingga menyebabkan pertumbuhan bakteri patogen dapat diganggu maupun tidak mampu sama sekali hidup.

Untuk mengetahui secara pasti jenis mikroorganismenya, maka salah satu teknologi terkini yang mampu mengidentifikasi spesies bakteri probiotik adalah dengan mengetahui struktur DNA, yakni dengan teknik sekuens 16S rDNA. Teknik ini merupakan teknik yang relatif baru yang belakangan sering diterapkan

karena bisa dibandingkan dengan basis data di GenBank untuk mengetahui kemiripan homologi DNA dengan bakteri yang sejenis.

Penelitian ini bertujuan untuk menguji antagonisme bakteri probiotik yang diisolasi dari lambung dan usus ikan kerapu terhadap bakteri patogen, yang diharapkan dapat menjadi inspirasi bagi nutrisinist dalam menciptakan pakan ikan kerapu, yang akhirnya dapat sebagai efisiensi pakan dan penanggulangan penyakit yang ditimbulkan oleh bakteri lain.

Metodologi

Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei - Oktober 2008, sampel ikan kerapu bebek diperoleh dari pasar bawah Pekanbaru. Isolasi dan identifikasi bakteri probiotik dilakukan pada usus dan lambung ikan kerapu bebek, pengujian antagonis isolat tersebut terhadap bakteri patogen dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Laut Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Riau, Sedangkan identifikasi secara molekuler dilakukan di Balai Pengkajian Bioteknologi Serpong Tangerang Provinsi Banten.

Strain bakteri probiotik diambil dari sampel yang digunakan adalah kerapu bebek yang berukuran 200-250 gram per ekornya, sebanyak 5 ekor, dan komponen yang diambil adalah usus dan lambungnya. Media yang digunakan adalah Tryptic Soya Agar (TSA). Usus dan lambung ikan kerapu dipisahkan masing-masing digerus dan diencerkan dalam larutan fisiologis 0,9%, dengan pH 2. Pada kondisi ini diharapkan yang mampu hidup hanyalah bakteri probiotik yang dapat tumbuh. Selanjutnya dilakukan penanaman pada media TSA. Koloni yang tumbuh diinokulasi lagi sampai diperoleh strain yang betul-betul murni. Sedangkan bakteri patogen *Vibrio sp*, *Aeromonas* dan *Pseudomonas sp* diperoleh dari koleksi laboratorium Mikrobiologi Laut.

Uji phylogenetik dilakukan dengan menguji pewarnaan gram, uji motilitas,, bentuk sel, pergandengan sel, kemampuan tumbuh pada suhu yang berbeda, pengamatan sifat koloni, uji katalase dan uji oksidase. Isolasi DNA *Vibrio*, Reaksi Polimerisasi Berantai, Elektroforesis dan Pengamatan Hasil PCR, Purifikasi Gel Elektroforesis, Sekuensing dan Analisis BLAST, Analisis BLAST dilakukan dengan mengedit urutan DNA hasil sekuensing dengan menterjemahkan N menjadi basa sesuai elektroferogram. Urutan DNA dicopy ke program Notepad. Lalu dilakukan penelusuran melalui website <http://www.ncbi.nih.nlm.gov/>. Data yang diperoleh dari hasil sekuensing dianalisis menggunakan teknik BLAST, paket program Clustal X, Genedoc, Treeview dan Bioedit. Kemudian hasil analisis disajikan secara deskriptif dalam bentuk tabel dan gambar. *Alignment* (penyejajaran) sekuens sampel dengan sekuens dari data base semua DNA *Vibrio* yang diteliti dilakukan menggunakan program *allignment* dari paket Clustal X. Untuk memperoleh dendogram digunakan program N-J pada Clustal X dengan tingkat 100 x bootstrap.

Uji antagonis bakteri probiotik dengan bakteri patogen dilakukan dengan metoda gores silang menurut metode (Schlegel 1994).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian bakteri probiotik yang terdapat pada saluran pencernaan ikan kerapu, yang diperoleh dari usus dan lambung, yaitu enam isolat yang terdapat pada lambung dan lima isolat yang terdapat pada usus. Masing-masing isolat tersebut diberi kode yaitu untuk lambung LproA, LproB, LproC, L ProD, L ProE, dan LproF, sedangkan untuk usus diberi kode UproA, UproB, UproC, UproD, dan UproE. Masing-masing isolat memiliki morfologi yang berbeda satu sama lain seperti yang dilihat pada tabel 1.

Dari hasil pengamatan morfologi yang dilakukan pada masing-masing koloni, maka bakteri tumbuh dengan bentuk yang berbeda-beda. Perbedaan tersebut karena bakteri mempunyai ciri-ciri morfologi tersendiri, hal ini yang membedakan satu sama lainnya. Perbedaan ini terdapat dari bentuk koloni, warna, tepian, permukaan bentuk sel dan tipe pergandengan sel. Berdasarkan pengamatan, koloni bakteri agak menonjol dari permukaan medium sehingga dengan mudah dilihat. Bentuk koloni pada umumnya bundar, selain itu juga berbentuk menyebar tidak beraturan. Sementara bentuk tepian dari bakteri bervariasi mulai dari tidak teratur, berombak, berlekuk dan seperti benang.

Hasil uji fisika dan biokimia isolat bakteri probiotik menunjukkan ada beberapa persamaan satu sama lainnya. Seluruh bakteri probiotik merupakan Gram positif. Sedangkan pengamatan motilitas yang dilakukan dibawah mikroskop menunjukkan bahwa sebagian besar isolat bersifat non motil dan ada juga yang bersifat motil. Bakteri yang bersifat motil memiliki satu flagella atau beberapa flagella yang terletak pada bagian yang bervariasi bergantung pada jenis dan spesies bakteri dan kondisi media kultur.

Hasil uji katalase menunjukkan bahwa semua isolat bakteri probiotik merupakan katalase positif, yang berarti memiliki enzim katalase. Sedangkan uji oksidase menunjukkan bahwa semua isolat merupakan oksidase negatif. Uji methyl red menunjukkan hasil bahwa sebahagian besar adalah negatif dan sebahagian lain adalah positif. fungsi dari uji methyl red merupakan untuk mengetahui kemampuan bakteri yang mampu memfermentasi glukosa menjadi asam campuran seperti asam laktat, asetat, suksinat asam format, CO₂, H₂ dan etanol (Feliatra 2011).

Hasil uji molekuler dengan amplifikasi DNA PCR universal isolat bakteri probiotik menghasilkan pita tunggal dengan ukuran sekitar 1500 bp (*base pare*) sesuai dengan perbandingan menggunakan marker DNA. Besarnya ukuran ini sesuai dengan ukuran yang diharapkan dari gen-gen 16s rDNA bakteri yaitu 1500-1600 bp. Dari sebelas isolat yang sudah bisa diisolasi, tapi hanya dua yang mampu diidentifikasi dengan molekuler yaitu DNA 16 s, yaitu isolat LproE dan isolat UproD.

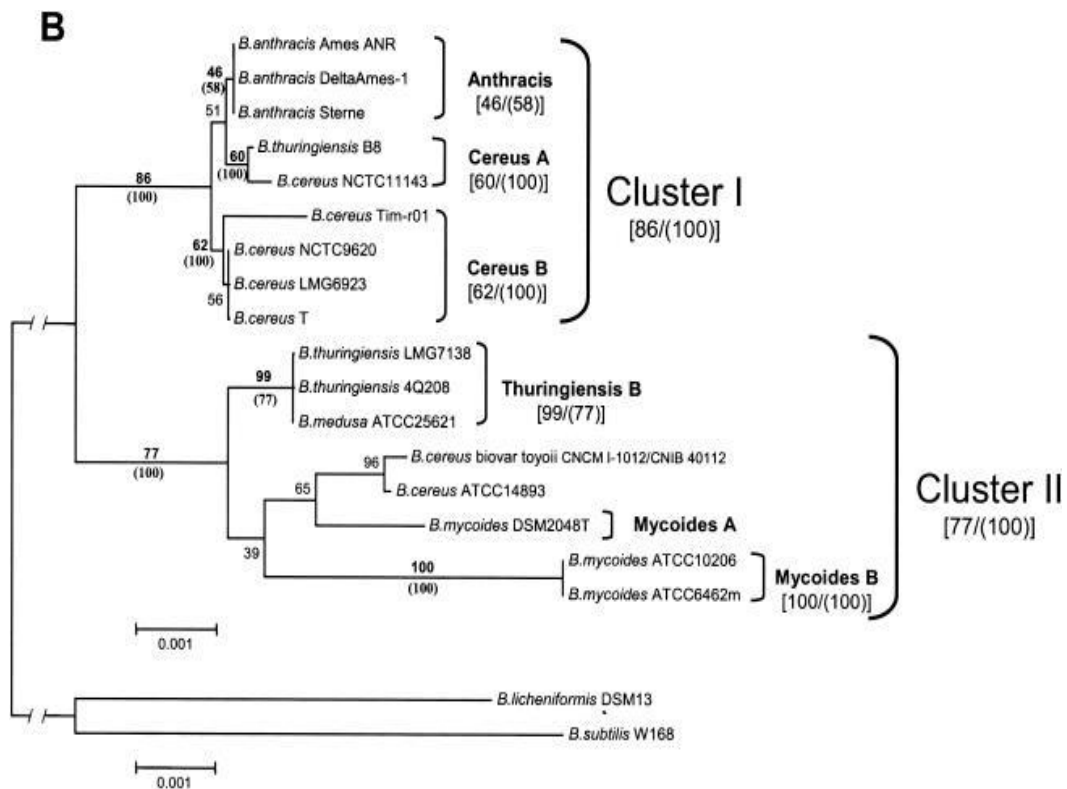
Tabel 1. Pengamatan Morfologi dan biokimia bakteri probiotik yang ditemukan

No	Nama Isolat	Bentuk koloni	Warna koloni	Tepian koloni	Bentuk sel	Gandeng sel	Gram	katalase	oksidase	Metil red	motil
1	LproA	Keriput	Kuning muda	Tdk beraturan	Stafilo	Diplo	-	+	-	+	+
2	LproB	Tdk beraturan	Krem	Berlekuk	Koma	Mono	+	+	-	+	-
3	LproC	Tdk beraturan	Kuning muda	berombak	Batang	mono	+	+	-	+	+
4	LproD	Bundar	Krem	Licin	kokus	mono	+	+	-	+	-
5	LproE	Tdk beraturan	Krem	Tdk beraturan	Koko basil	mono	+	+	-	+	+
6	LproF	Tdk beraturan	Kuning muda	berlekuk	Koko basil	mono	+	+	-	+	-
7	UProA	Bundar	Kuning tua	Tdk beraturan	Kokus	Mono	+	+	-	+	+
8	UproB	Bundar	Kuning	Licin	Kokus	Mono	+	+	-	-	+
9	UproC	Tdk beraturan	Kuning	Tidak beraturan	Kokus	Diplo	+	+	-	-	-
10	UproD	Bundar	Kuning	Licin	Kokus	Mono	+	+	-	+	-
11	UproE	Tdk beraturan	krem	belekuk	batang	mono	+	+	-	+	-

Hasil penelusuran sekuense masing-masing isolat bakteri dengan sistem Blast dapat diketahui spesies bakteri probiotik yang diperoleh, bakteri yang diambil dari lambung adalah spesies *Bacillus Cereus* dengan homolog sebesar 99% dengan no akses EU240375.1. dan isolat yang diisolasi dari usus adalah spesies *Strenotrophomonas maltophilia*. Hagstrom et al (2000) menyatakan bahwa isolat yang mempunyai persamaan sekuens 16S rDNA lebih besar dari 97% dapat mewakili spesies yang sama. Sedangkan persamaan sekuen antara 93%-97% dapat mewakili identitas pada tingkat genus tetapi berbeda pada tingkat spesies.

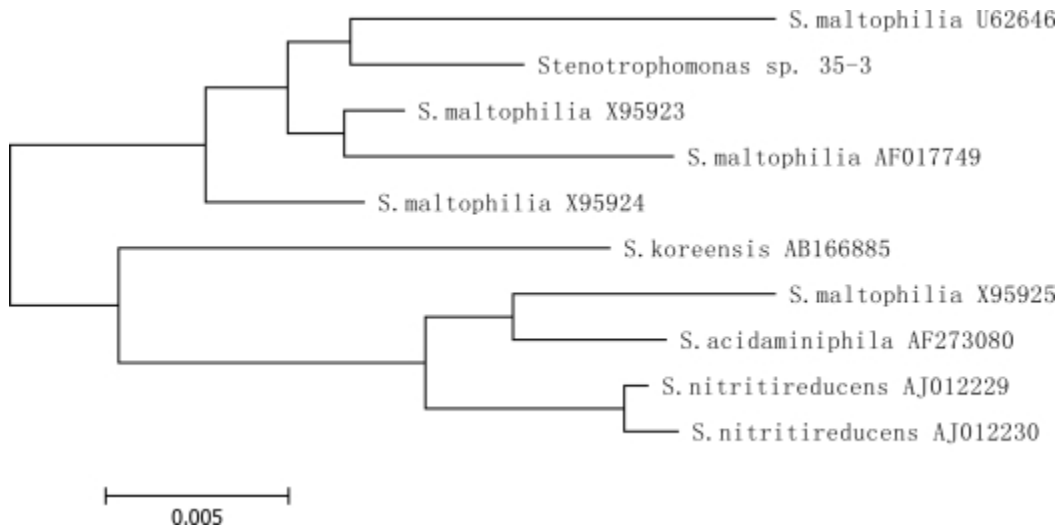
Isolat yang dapat pertama yang dapat diidentifikasi termasuk pada genus *Bacillus* dan spesies *Bacillus cereus*, dengan ciri morfologi dan uji biokimia dapat dilihat pada tabel 1 dengan kode LproE. Bakteri ini sangat resisten terhadap lingkungan yang tidak menguntungkan, tidak tahan terhadap udara terbuka, aerobik atau aerobik fakultatif. Menurut Turnes *et al*, 1999 Di antara berbagai jenis probiotik, genus *Bacillus* memiliki keuntungan bahwa, kapasitas mereka untuk bersporulasi, bertahan hidup pada suhu lingkungan serta selama pengeringan dengan metode yang melibatkan pemanasan modern, seperti pengering kering, menghindari penggunaan dari liofilisasi atau teknologi mahal lainnya.

Susunan basa (DNA) bakteri *Bacillus cereus* dapat dilihat pada pada tabel 2. Spora dari jenis bakteri ini tahan terhadap panas dan kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan dan mampu membentuk kecambah dalam larutan yang mengandung NaOH dan HCL (Vecci dan Drago, 2006). Selanjutnya dinyatakan bahwa Bakteri *Bacillus cereus* memiliki nilai waktu generasi dan konstanta laju pertumbuhan sebesar 18 menit dan $2,27 \text{ jam}^{-1}$ yang diidentifikasi pada lumpur hasil pengolahan limbah cat (Dwipayana dan Ariesyady, 2009).



Gambar 1. Pohon phylogenetik bakteri bacillus ceereus.

Isolat kedua adalah UproD, dari hasil analisis molekuler maka isolat ini termasuk pada spesies *Stenotrophomonas maltophilia*. Pohon filogeneticnya dapat dilihat sebagaimana pada gambar 2 dibawah ini. Bakteri ini memiliki peran yang cukup dikenal dilingkungan, menurut Guan *et al* (2008) menyatakan bahwa bakteri ini mampu dengan baik menguraikan aflatoxin (B1) sebanyak 46% dalam waktu kurang dari 12 jam penyimpanan dan 78 % dari penyimpanan 72 jam. Menurut Kuddus *et al* (2009) menyatakan bahwa bakteri *Stenotrophomonas maltophilia* bisa memproduksi enzim yang bisa dijadikan dalam aplikasi industri. Bakteri ini bisa memproduksi Protease 56,2 UML-1 pada suhu 20 C dan pH 9,0 setelah inkubasi 120 jam.



Gambar 2. Pohon filogenetik bakteri *Stenotrophomonas maltophilia*

Efektifitas bakteri probiotik yang ditemukan, dilihat melalui antagonis bakteri probiotik yang ditemukan dengan bakteri patogen pada ikan. Metode yang digunakan adalah metode gores silang. Bakteri *Bacillus cereus* memberikan respon positif yaitu terbentuknya hambatan yang terjadi pada pertumbuhan bakteri *Aeromonas sp* dan *vibrio sp*, respon ini terlihat dengan terbentuknya zona yang terputus oleh adanya pertumbuhan bakteri *Bacillus cereus*, tetapi tidak terjadi pada bakteri *Pseudomonas beteli* yang tidak terlihat adanya pembentukan zona yang terputus oleh adanya pertumbuhan bakteri *Bacillus cereus*, hal ini disebabkan zat metabolit yang dihasilkan tidak cukup kuat untuk menghambat bakteri *Pseudomonas beteli*. Ini artinya bakteri *Bacillus cereus* yang ditemukan dapat menghambat bakteri *Aeromonas sp* dan *vibrio sp* tetapi tidak dapat menghambat bakteri *Pseudomonas beteli*.

Bakteri *Stenotrophomonas maltophilia* tidak memberikan dampak terhadap bakteri *Aeromonas sp* dan *Pseudomonas beteli*, karena tidak adanya gangguan pertumbuhan dan pembentukan zona atau daerah yang menghambat pertumbuhan bakteri *Aeromonas sp* dan *Pseudomonas beteli*.

Tabel 2. Susunan basa bakteriprobiotik yang ditemukan Amplifikasi DNA Isolat bakteri

No	Isolat	Sekuens gen 16 s rDNA
1	LproE	5' AAGGCATAATAAATGGCAAAGGTCGAGTTGAATGGATTAAGAG GCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCCGACGGGTGAGTAACACGT GGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGG GCTAATACCGGATAACATTTTGAAGTGCATGGTTTCGAAATTGAA AGGCGGCTTCGGCTGTCACCTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTA GCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAG CCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAAT GGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGC TTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAG TTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCAC GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA GCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTT CTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTC ATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAAT TCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACC AGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTGCAGTGCAGGCG CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCT TTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCCACTCCCCCCCCCGTGAA 3'
2	UproD	5' ACTTCCCCCCTTGGGGTGGTTGACGGGCGGTGGTTACAAGGC CCGGGAACGTAAACACCGCAGCAATGGCTGATCTGCGACTACTA GCGATTCCGACTYCATGGAGTCAAGTTGCAGACTCCAATCCGGA CTGAGATAGGGTTTCTGGGATTGGCTTACCGTCCCGGTTTGCA CCCTTCTGTCCCTACCTTTGTAGTAGGTGTGTAGCCCTGGCCGTA AGGGCCATGATGACTTGACTTCATCCCCACCTTCCTCCGTTTG CTAAGGACAAGGGTTGCGCTCATTGCGGGACTTAACCCAACAT CTCACGACACGAGCTGACAACAGCCATGGAGCACCAGTGTTTCG ATTTTC 3'

Kemampuan bakteri *Bacillus cereus* dalam menghambat atau menginterupsi bakteri patogen belum dipastikan apakah karena dapat mematikan atau menghasilkan antibiotik yang dapat menurunkan populasi bakteri patogen secara keseluruhan. Menurut Prangdimurti (2001) antagonisme ada dua macam yaitu antagonisme sejati dan antagonisme vektor. Antagonisme sejati terjadi jika suatu organisme benar-benar menghambat organisme lainnya, sedangkan antagonisme vektor terjadi jika suatu jenis bakteri menghambat bakteri lain secara aktif karena makanan dan kehidupan yang terbatas. Probiotik mungkin meningkatkan aktifitas pencernaan oleh sintesa vitamin, kofaktor atau meningkatkan aktifitas enzim (Fuller, 1989). Kondisi ini akan meningkatkan berat badan, proses digesti atau penyerapan nutrisi

KESIMPULAN

Usus dan lambung ikan kerapu bebek memiliki potensi sebagai sumber bakteri probiotik, yang dapat dikembangkan, Bakteri probiotik pada usus berbeda dengan bakteri probiotik yang ada pada lambung. Kemampuan antagonis bakteri probiotik pada bakteri patogen berbeda-beda, tergantung kepada isolatnya. Satu spesies bakteri probiotik *Bacillus cereus* merupakan bakteri probiotik yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen, *Vibrio sp* dan *Aeromonas sp*, tetapi tidak dapat menghambat bakteri *Pseudomonas beteli*.

SARAN

Tingkat antagonis bakteri probiotik yang ditemukan terhadap bakteri patogen masih perlu dilakukan uji lanjut, diantaranya uji tingkat kemampuan dan mekanisme bakteri probiotik dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Perlu juga dilakukan analisis jenis metabolit primer atau metabolit sekunder yang dihasilkan bakteri probiotik yang menghambat atau membunuh bakteri patogen *vibrio sp*, *Pseudomonas sp* dan *aeromonas sp*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh kemenristek tahun 2007 dan 2008 dari program insentif riset dasar.

DAFTAR PUSTAKA

- Dwipayana dan Ariesyady, H.D. 2009. Identification of Bacterial Diversity in Waste Recycling Paint Sludge by Conventional Microbiological Technique. Environmental Engineering Study Program. Bandung.
- Feliatra. 2002. Implementasi dan pengembangan Bioteknologi kelautan dalam upaya optimalisasi pemanfaatan laut Indonesia. Pidato pengukuhan Jabatan guru u besar Pada Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Riau. Pekanbaru 31 hal.
- Feliatra, Nugroho, F., Sazali, T. dan Yuslina, S. 2011. Molecular Characteristics of *Vibrio sp* Causing Giant Tiger Prawn (*Penaeus monodon*) Disease By DNA 16s Sequencing. Agricultural Technology: 7 No 3 (679-694)
- Fuller, R. 1989. A review, probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66:365-378.
- Guan, S., Cheng Ji, Ting Zhou, Junxia Li, Qiugang Ma, and Tianguai Niu 2008. Aflatoxin B₁ Degradation by *Stenotrophomonas Maltophilia* and Other Microbes Selected Using Coumarin Medium. *Int J Mol Sci.* 2008 August; 9(8): 1489–1503.

- Hagstrom, A.J., Pinhassi, F. and Zweiefel, U.L. 2000. Biogeographical Diversity Among Marine Bacterioplankton. *Aquatic Microbial Technology*, vol 21: 231-244.
- Ismi, S.2004. Sistem pemeliharaan ikan kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*) di hatchery skala rumah tangga. Prosiding lokakarya perhimpunan pemuliaan Indonesia VII. Dukungan Pemuliaan terhadap industri pembenihan pada era Pertanian kompetitif. Balitkabi 1. Malang. Hal 657-661.
- Kuddus, Mohammed, Ramteke, dan Pramod, W. 2009. Cold-active extracellular alkaline protease from an alkaliphilic *Stenotrophomonas maltophilia*: production of enzyme and its industrial applications. *Canadian Journal of Microbiology*. Vol. 55 : 11, p1294
- Pangastuti, A. 2006. Definisi Spesies Prokaryota Berdasarkan Urutan Basa Gen Peyandi 16S rRNA dan Gen Penyandi Protein. *Jurnal Biodiversitas ISSN* 1412 – 033x
- Prangdimurti, E. 2001. Probiotik dan efek Perlindungan Terhadap Kanker Kolon. Program Pasca sarjana Institut Pertanian Bogor. 14 hal.
- Sugama. K., Tridjoko, B., Slamet, S., Ismi E., Setiadi dan Kawahara, S. 2001. Petunjuk teknis produksi benih ikan Kerapu Bebek. Balai Besar Riset Perikanan Laut p 1- 13.
- Turnes, C.G., Andrea Freitas dos Santos, Flávia Weykamp da Cruz, and Alegani Vieira Monteiro.1999. Properties of the *Bacillus cereus* strain used in probiotic CenBiot. *Rev. Microbiol.* 30:1-5