

Isolasi dan Identifikasi Bakteri Probiotik pada *Rastrelliger* sp.

Isolation and Identification of Probiotic Bacteria in *Rastrelliger* sp.

Cut YULVIZAR¹⁾

¹⁾Biology Department, Faculty of Mathematics and Natural Sciences,
Syiah Kuala University, Indonesia
Email: Yunda_mnz@yahoo.com

Abstract. Probiotics are beneficial microbes to improve microbial balance in the digestive tract. Isolation of probiotic bacteria aims to obtain the potential probiotic bacteria in mackerel (*Rastrelliger* sp.). This research used descriptive methods. The results showed that there were five potential isolates of probiotic bacteria. Physiological test for identification indicates three bacteria genera (Micrococcus, Staphylococcus and Bacillus) and one species (*Hafnia alvei*) which are potential probiotic bacteria isolated from mackerel.

Key words: Probiotics, *Rastrelliger* sp., isolation and identification

Abstract. Probiotik merupakan mikroba menguntungkan yang bermanfaat untuk memperbaiki keseimbangan mikroba di dalam saluran pencernaan. Isolasi bakteri probiotik dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan bakteri yang berpotensi sebagai probiotik pada ikan kembung (*Rastrelliger* sp.). Penelitian ini menggunakan metode deskriptif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat lima isolat bakteri yang berpotensi sebagai probiotik. Hasil uji fisiologis untuk identifikasi bakteri menunjukkan adanya tiga genera (Micrococcus, Staphylococcus dan Bacillus) dan satu spesies bakteri (*Hafnia alvei*) yang berpotensi sebagai probiotik pada ikan kembung (*Rastrelliger* sp.).

Kata kunci: Probiotik, *Rastrelliger* sp., isolasi, dan identifikasi.

PENDAHULUAN

Negara Indonesia dikenal sebagai negara bahari dengan wilayah lautnya mencakup tiga perempat luas Indonesia atau 5,8 juta km² dengan garis pantai sepanjang 81.000 km, sedangkan luas daratannya hanya 1,9 km². Wilayah laut yang sangat luas tersebut mengandung sumberdaya alam (perikanan) yang sangat berlimpah dan memiliki banyak sekali jenis ikan (sekitar 3.000 jenis ikan), salah satunya adalah ikan kembung (Bahar, 2006).

Ikan kembung (*Rastrelliger* sp.) merupakan salah satu jenis ikan laut yang mudah didapatkan dan banyak dikonsumsi masyarakat karena memiliki harga yang relatif ekonomis (Santoso *et al.*, 1997). Kandungan protein pada daging ikan kembung cukup tinggi (18,5%),

sedangkan kandungan lemaknya jauh lebih rendah (2,1%) (Zamroni *et al.*, 2008).

Bakteri pada ikan dapat dijumpai pada permukaan tubuh eksternal dan saluran pencernaan. Sebagian bakteri bersifat patogen, sedangkan sejumlah bakteri lainnya menguntungkan bagi ikan karena membantu pencernaan, mensintesa vitamin-vitamin serta mendekomposisi materi organik di perairan (Irianto, 2005). Hal ini diduga karena adanya peran bakteri probiotik. Prinsip dasar kerja probiotik adalah dengan memanfaatkan kemampuan mikroba untuk mempermudah penyerapan oleh saluran pencernaan ikan (Feliatra dan Suryadi, 2004).

Probiotik adalah mikroba hidup menguntungkan pada makhluk hidup, yang bermanfaat untuk memperbaiki keseimbangan mikroba di dalam

saluran pencernaan (Afrianto dan Liviawaty, 2005) dan memberikan pengaruh positif terhadap fisiologi dan kesehatan inangnya. Senyawa-senyawa racun yang dihasilkan pada metabolisme bakteri probiotik seperti asam laktat, hidrogen peroksida, bakteriosin yang bersifat antimikroba dan antibiotik mampu menekan pertumbuhan bakteri patogen (Yulinery *et al.*, 2006). Menurut Kanmani *et al.* (2010), salah satu karakteristik bakteri probiotik yaitu memiliki ketahanan yang tinggi terhadap asam.

Mengingat informasi mengenai identifikasi morfologi dan fisiologi dari bakteri yang berpotensi sebagai probiotik pada ikan kembung (*Rastrelliger* sp.) masih sangat terbatas, maka perlu dilakukan isolasi bakteri probiotik yang terdapat pada lambung dan usus ikan tersebut.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Syiah Kuala, dari bulan April-Agustus 2012. Alat yang digunakan adalah inkubator, autoklaf, erlenmeyer, *hotplate*, aluminium foil, lampu bunsen, cawan petri, timbangan digital, mortar porselen, gelas ukur, tabung reaksi, pipet tetes, mikroskop, kaca objek, jarum ose, kamera digital dan alat tulis.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan kembung segar, media TSA (*Tryptone Soya Agar*), media TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*), media SIM (*Sulfid Indol Motility*), media MR-VP (*Methyl Red dan Voges Proskaurt*), media *Simmons Citrate*, reagen Kovac, indikator *methyl red* (merah metil), bahan untuk uji pewarnaan Gram (kristal violet, lugol iodine, safranin, alkohol 95% dan akuades), NaCl, hidrogen peroksida (H_2O_2), kapas, MICROBACT™ 24E *Gram-Negative Identification System* (OXOID), *reagent indole*, VP I, VP II, *Nitrate A*, *Nitrate B*, TDA dan *mineral oil*.

Prosedur Penelitian

Sterilisasi alat dan bahan. Semua alat dan bahan yang akan digunakan disterilkan dengan autoklaf pada temperatur 121°C pada tekanan uap 15 lb/in² selama 15 menit (Marlina, 2008).

Pengambilan sampel. Bakteri probiotik diisolasi pada organ pencernaan berupa lambung dan usus ikan kembung segar. Ikan dibedah untuk diambil bagian lambung dan usus, lalu dimasukkan ke dalam larutan fisiologis NaCl 0,9% pada pH 2 (Feliatra dan Suryadi, 2004). Selanjutnya, lambung dan usus dihancurkan atau dihaluskan dengan menggunakan mortar porselen.

Isolasi bakteri. Sampel yang telah dihaluskan, kemudian dilakukan seri pengenceran. Metode seri pengenceran yang dilakukan dengan mengambil sebanyak 1 g sampel, dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml akuades sehingga didapat pengenceran 10^{-1} , untuk mendapatkan pengenceran 10^{-2} dilakukan dengan mengambil 1 ml dari pengenceran 10^{-1} dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml akuades, demikian seterusnya dilakukan seri pengenceran hingga 10^{-5} . Pengenceran 10^{-4} dan 10^{-5} diambil 1 ml kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri yang telah berisi media TSA dan diratakan, lalu diinkubasi dengan posisi cawan terbalik selama 24-48 jam pada temperatur 30°C (Darmayasa, 2008).

Identifikasi bakteri. Setelah inkubasi selama 48 jam, dilakukan isolasi bakteri dengan metode goresan kuadran beberapa tahap hingga diperoleh 1 isolat yang murni. Isolat-isolat yang diperoleh kemudian diidentifikasi dengan berpedoman pada buku *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium* (Hadioetomo, 1993), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994) dan menggunakan MICROBACT™ 24E *Gram-Negative Identification System* (OXOID) (Oxoid, 2005). Pengamatan morfologi sel yang meliputi uji pewarnaan Gram, bentuk sel dan uji motilitas, serta uji sifat fisiologis yaitu uji katalase, uji indol, uji MR-VP, uji *Simmons Citrate*, dan uji TSIA.

Morfologi Sel

a. Pewarnaan Gram. Kaca objek dibersihkan dengan alkohol dan dilewatkan beberapa kali pada nyala api bunsen, kemudian diambil isolat bakteri dengan jarum ose secara aseptik dan dioleskan pada kaca objek. Isolat bakteri kemudian ditetesi ungu violet dan dibiarkan selama 1 menit, selanjutnya dicuci dengan air mengalir dan dianginkan hingga kering. Isolat

bakteri kemudian ditetesi lagi dengan larutan iodine dan dibiarkan selama 1 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dianginkan hingga kering. Selanjutnya isolat bakteri ditetesi alkohol 95% selama 30 detik, kemudian dialiri air dan dianginkan hingga kering. Isolat bakteri kemudian ditetesi safranin selama 30 detik dan dicuci dengan air mengalir, dikeringkan dengan kertas penghisap dan dikering anginkan, kemudian dilakukan pengamatan dengan menggunakan mikroskop. Bakteri gram positif ditandai dengan warna ungu yang menunjukkan bahwa bakteri tersebut mampu mengikat warna kristal violet, sedangkan bakteri gram negatif ditandai dengan warna merah muda yang menunjukkan bahwa bakteri tersebut tidak mampu mengikat warna kristal violet dan hanya terwarnai oleh safranin (pewarna tandingan) (Hadioetomo, 1993).

b. Bentuk sel. Bakteri yang tumbuh kemudian diamati bentuk selnya secara mikroskopik pada kaca preparat sehingga dapat diketahui bentuknya (kokus, batang atau spiral).

Sifat fisiologi

a. Uji katalase. Diletakkan 2 tetes H₂O₂ pada kaca objek yang bersih. Isolat bakteri diambil menggunakan jarum ose, kemudian dipindahkan ke atas kaca objek dan dicampurkan. Uji positif ditandai dengan terbentuknya gelembung-gelembung oksigen yang menunjukkan bahwa organisme yang bersangkutan menghasilkan enzim katalase yang mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen (Hadioetomo, 1993).

b. Uji motilitas. Isolat bakteri ditusukkan ke dalam media SIM semi padat pada tabung reaksi menggunakan jarum ose tusuk steril. Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Uji positif ditandai dengan pertumbuhan bakteri yang menyebar, maka bakteri tersebut bergerak (motil) dan bila pertumbuhan bakteri tidak menyebar hanya berupa satu garis, maka bakteri tersebut tidak bergerak (non motil) (Sudarsono, 2008).

c. Uji Indol. Diambil satu koloni terpisah dengan menggunakan jarum ose, kemudian diinokulasi ke dalam media SIM dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah inkubasi ditambahkan 10-12 tetes reagen Kovac. Uji

positif ditandai dengan terbentuknya lapisan berwarna merah di bagian atas biakan (Hadioetomo, 1993).

d. Uji MR. Diambil satu koloni terpisah dengan menggunakan jarum ose, kemudian diinokulasi ke dalam media MR-VP dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Pada uji MR, ditambahkan 3-4 tetes indikator merah metil. Uji positif ditandai dengan perubahan warna medium menjadi merah, artinya terbentuk asam (Hadioetomo, 1993).

e. Uji *Simmons Citrate*. Diambil satu koloni terpisah dengan menggunakan jarum ose dan diinokulasikan pada media *Simmons Citrate* lalu diinkubasi pada temperatur 37°C selama 24 jam. Diamati adanya perubahan warna pada medium biakan (Hadioetomo, 1993). Uji positif ditandai dengan berubahnya warna medium menjadi biru (Sudarsono, 2008).

f. Uji TSIA. Diambil sebagian kecil koloni bakteri dengan menggunakan ose dan diinokulasikan pada media TSIA, kemudian dilakukan dengan cara menusuk tegak lurus pada bagian *butt* (tusuk) dan cara zig zag pada bagian *slant* (miring). Diinkubasi pada temperatur 37°C selama 24 jam. Diamati perubahan warna medium yang terjadi. Apabila bagian *slant* berwarna merah dan *butt* berwarna kuning maka bakteri mampu memfermentasi glukosa, sedangkan apabila bagian *slant* dan *butt* keduanya berwarna kuning maka bakteri mampu memfermentasi sukrosa dan laktosa (Yusuf, 2009).

Parameter penelitian

Adapun parameter dari penelitian ini meliputi (i) jumlah isolat; (ii) morfologi sel yaitu sifat pewarnaan Gram, bentuk dan motilitas dari isolat bakteri; dan (iii) sifat fisiologis dari isolat bakteri yang berpotensi sebagai bakteri probiotik pada ikan kembung (*Rastrelliger* sp.).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji fisiologis

Uji fisiologis merupakan tahapan lanjutan yang diperlukan untuk mengidentifikasi suatu bakteri (Darmayasa *et al.*, 2008). Uji fisiologis yang

dilakukan dalam penelitian ini meliputi uji katalase, uji indol, uji MR, uji *Simmons Citrate* dan uji TSIA.

Berdasarkan Tabel 3.1, isolat LUI-01, LUI-02, LUI-03 dan LUI-04 menunjukkan katalase yang positif (80%) dan isolat LUI-05 menunjukkan katalase yang negatif (20%). Dari data tersebut hanya empat isolat bakteri yang menghasilkan enzim katalase. Menurut Lay (1994), uji katalase digunakan untuk mengetahui adanya enzim katalase pada isolat bakteri. Katalase merupakan enzim yang dapat mengkatalisis penguraian hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi air dan O_2 . Hidrogen peroksida bersifat toksis terhadap sel bakteri karena bahan ini mampu menonaktifkan enzim dalam sel dan sangat berbahaya bagi sel bakteri itu sendiri. Uji ini sangat penting dilakukan untuk mengetahui sifat dari suatu bakteri terhadap kebutuhan oksigen.

Hasil uji indol menunjukkan bahwa lima isolat bakteri memberikan nilai negatif (100%) yang berarti tidak ada isolat bakteri yang dapat membentuk indol. Indol merupakan senyawa yang mengandung nitrogen yang terbentuk sebagai hasil pemecahan amino tryphosphat. Pentingnya uji indol ini adalah karena hanya beberapa jenis bakteri saja yang dapat membentuk indol dan produk ini dapat diuji sehingga dapat digunakan sebagai identifikasi.

Berdasarkan Tabel 3.1, hasil pengamatan dari uji *methyl red* (MR) ini menunjukkan bahwa semua isolat bakteri tidak dapat mengoksidasi glukosa yang berarti menunjukkan hasil negatif (100%). Menurut Sudarsono (2008), uji merah metil (*methyl red test*) bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri untuk mengoksidasi glukosa dengan memproduksi asam dengan konsentrasi tinggi sebagai hasil akhirnya. Jika media MR-VP akan menjadi merah setelah ditambahkan merah metil menunjukkan bahwa hasil uji positif, sedangkan jika media tetap berwarna kuning menunjukkan hasil uji negatif.

Selanjutnya pada Tabel 3.1 juga dapat dilihat bahwa hanya isolat LUI-03 yang mampu menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon pada uji *Simmons Citrate* dan mengubah warna medium menjadi biru yang berarti positif (20%) dan isolat LUI-01, LUI-02, LUI-04 dan LUI-05 menunjukkan hasil yang

negatif (80%). Menurut Hadioetomo (1993), media sitrat *simmons* merupakan salah satu medium yang digunakan untuk menguji kemampuan bakteri dalam menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon yang digunakan. Bila bakteri mampu tumbuh dengan menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon maka akan terlihat perubahan warna pada media tumbuh bakteri pada permukaan agar miring akan menjadi warna biru.

Tabel 3.1 Uji fisiologis lima isolat bakteri yang berpotensi sebagai probiotik

No	Jenis Uji	Isolat				
		LUI-01	LUI-02	LUI-03	LUI-04	LUI-05
1	Uji Katalase	+	+	+	+	-
2	Uji Indol	-	-	-	-	-
3	Uji MR	-	-	-	-	-
4	Uji <i>Simmons Citrate</i>	-	-	+	-	-
5	Uji TSIA	m/k	k/k	k/k	k/k	m/k

Keterangan:

+ : Terjadi reaksi

- : Tidak terjadi reaksi

m/k : Slant merah/butt kuning

k/k : Slant kuning/butt kuning

Tabel 3.1. menunjukkan bahwa isolat LUI-01 dan LUI-05 mampu memfermentasikan glukosa (40%), sedangkan isolat LUI-02, LUI-03 dan LUI-04 mampu memfermentasikan laktosa dan sukrosa (60%). Berdasarkan pengamatan, tidak terdapat isolat yang memiliki enzim desulfurase yang berfungsi untuk memecah sistein dan menghasilkan gas yang ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna hitam pada dasar media. Menurut Sudarsono (2008), media TSIA mengandung tiga macam gula yaitu glukosa, laktosa, atau sukrosa. Uji TSIA ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan dari suatu bakteri dalam memfermentasi gula untuk menghasilkan asam atau gas. Warna merah pada agar menunjukkan reaksi basa, sedangkan warna kuning menunjukkan reaksi asam. Warna merah pada permukaan agar dan kuning di bagian bawah agar menunjukkan bahwa terjadinya fermentasi glukosa. Warna kuning pada bagian permukaan dan bawah tabung menunjukkan terjadinya fermentasi laktosa dan sukrosa.

Identifikasi isolat

Identifikasi genus dari suatu bakteri memerlukan karakter-karakter utama dari bakteri yaitu morfologi sel (bentuk sel dan susunan sel), uji biokimia dan tipe fermentasi (Suryani *et al.*, 2010). Isolat yang berpotensi sebagai probiotik pada hasil penelitian ini diperoleh lima isolat bakteri dengan tiga jenis genera dan satu spesies bakteri yang memiliki kesamaan genus pada penelitian-penelitian sebelumnya. Pada penelitian ikan laut diperoleh isolat-isolat yang berpotensi sebagai probiotik yaitu gram positif (*Bacillus*, *Lactococcus*, *Micrococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Weissella*) dan gram negatif (*Aeromonas*, *Alteromonas*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*, *Vibrio*) (Marzouk *et al.*, 2008). Empat jenis genus yang didapat dari penelitian Feliatra dan Suryadi (2004) yaitu genus *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Eubacterium*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, dan *Bifidobacterium*. Penelitian Ghosh *et al.* (2007) mendapatkan empat jenis genus yaitu *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Edwardsiella* dan *Bacillus*. Berikut tiga genus dan satu spesies isolat yang ditemukan pada lambung dan usus ikan kembung (*Rastrelliger* sp.) adalah:

1. LUI-01 dan LUI-02 (Genus *Micrococcus*)

Bakteri yang mendekati genus ini memiliki ciri-ciri morfologi yaitu gram positif, bentuk sel bulat dan non motil. Bentuk koloni bundar, tepian koloni licin, elevasi koloni pada LUI-01 cembung dan LUI-02 timbul, warna koloni pada LUI-01 coklat kemerahan dan LUI-02 krem. Katalase positif, indol negatif, uji MR negatif, uji sitrat negatif dan TSIA pada LUI-01 memiliki warna permukaan merah dan bawah kuning, sedangkan LUI-02 memiliki warna permukaan dan bawah kuning. Menurut Holt *et al.* (1994) bakteri *Micrococcus* sp. gram positif, jarang motil dan kebanyakan non motil, koloni berwarna kekuningan sampai merah, tumbuh pada media yang sederhana, katalase positif, indol negatif, pada uji TSIA ada yang mampu memfermentasi glukosa dan ada yang mampu memfermentasi laktosa dan sukrosa, tumbuh optimum pada suhu 25°C-37°C.

2. LUI-03 (Genus *Staphylococcus*)

Bakteri yang mendekati genus ini memiliki ciri-ciri morfologi yaitu gram positif, bentuk sel bulat dan motil. Bentuk koloni bundar, tepian koloni licin, elevasi koloni timbul dan warna koloni putih susu. Katalase positif, indol negatif, uji MR negatif, uji sitrat positif dan TSIA memiliki warna permukaan dan bawah kuning. Menurut Holt *et al.* (1994) bakteri *Staphylococcus* sp. gram positif, motilitas berubah-ubah, kebanyakan motil, koloni biasanya buram, warna koloni putih susu atau krem. Bakteri ini memiliki katalase positif dan oksidase negatif, sering mengubah nitrit menjadi nitrat, mampu memfermentasi laktosa dan sukrosa, tumbuh optimum pada temperatur 37°C. Beberapa spesies ada yang patogen pada manusia dan hewan.

3. LUI-04 (Genus *Bacillus*)

Bakteri yang mendekati genus ini memiliki ciri-ciri morfologi yaitu gram positif, bentuk sel bulat, batang dan motil. Bentuk koloni bundar, tepian koloni berombak, elevasi koloni cembung dan warna koloni kuning atau krem. Katalase positif, indol negatif, uji MR negatif, uji sitrat negatif dan TSIA memiliki warna permukaan dan bawah kuning. Menurut Holt *et al.* (1994) bakteri *Bacillus* sp. gram positif, motil dengan flagel peritrik. Endospora oval, kadang-kadang bundar atau silinder dan sangat resisten pada kondisi yang tidak menguntungkan. Warna koloni putih susu sampai kekuningan dengan tepian berombak. Bakteri ini bersifat aerobik. Katalase dan oksidase positif. Indol negatif dan mampu memfermentasi glukosa serta laktosa dan sukrosa. Tersebar luas pada bermacam-macam habitat dan sedikit spesies yang patogen. Suhu tumbuh optimum pada 28°C-35°C.

4. LUI-05 (Spesies *Hafnia alvei*)

Bakteri ini memiliki ciri-ciri morfologi yaitu gram negatif, bentuk sel bulat dan non motil. Bentuk koloni bundar, tepian koloni licin, elevasi koloni timbul dan warna koloni krem. Katalase negatif, indol negatif, uji MR negatif, uji sitrat negatif dan TSIA memiliki warna permukaan merah dan bawah kuning. Proses identifikasi pada bakteri ini menggunakan MICROBACT™ 24E Gram-Negative Identification System (OXOID).

Berdasarkan pengujian menggunakan *kit microbact*, didapatkan bahwa isolat LUI-05 merupakan spesies *Hafnia alvei* dengan tingkat kebenaran 82,76% (*percent probability*) (Oxoid, 2005). *Hafnia alvei* merupakan salah satu jenis bakteri yang diidentifikasi sebagai pembentuk Histamin yang lemah (Indriati *et al.*, 2006). Menurut Rodriguez *et al.*, (1998) bahwa bakteri ini dianggap sebagai bakteri patogen oportunistik yang secara alami terdapat pada saluran pencernaan Identifikasi isolat LUI-05 menggunakan *kit microbact* 24E.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan terdapat lima isolat yang berpotensi sebagai probiotik dari lambung dan usus ikan kembung (*Rastrelliger* sp.). Kelima isolat tersebut terdiri dari tiga genera bakteri yaitu *Micrococcus*, *Staphylococcus* dan *Bacillus* serta satu spesies bakteri yaitu *Hafnia alvei*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan bagian dari proyek penelitian magister penulis yang dibiayai oleh DAAD. Penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang tinggi kepada Dr. Ronald F. Kuehne dan Prof. Dr. med. Uwe Gross atas segala dukungan, bimbingan, dan perhatiannya selama penulis melakukan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

Afrianto E dan Liviawaty E. 2005. *Pakan Ikan*. Kanisius, Yogyakarta.

Bahar B. 2006. *Panduan Praktik Memilih dan Menangani Produk Perikanan*. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.

Darmayasa IBG. 2008. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Pendegradasi Lipid (Lemak) pada Beberapa Tempat Pembuangan Limbah dan Estuari DAM Denpasar. *Jurnal Bumi Lestari* 8:122-127.

Feliatra E dan Suryadi E. 2004. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Probiotik dari Ikan Kerapu Macan (*Ephinephelus fuscogatus*) dalam Upaya Efisiensi

Pakan Ikan. *Jurnal Natur Indonesia*. 6(2): 75-80.

Ghosh S, Sinha A, and Sahu C. 2007. Isolation of Putative Probiotics From the Intestines of Indian Major Carps. *The Israeli Journal of Aquaculture*. 59(3): 127-132.

Hadioetomo RS. 1993. *Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium*. Penerbit Gramedia, Jakarta.

Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, dan William ST. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Lippincott William and Wilkins, New York.

Indriati N, Rispayeni, dan Heruwati ES. 2006. Studi Bakteri Pembentuk Histamin pada Ikan Kembung Peda Selama Proses Pengolahan. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. 1(2): 117-123.

Irianto A. 2005. *Patologi Ikan Teleostei*. Gajah Mada University Press, Yogyakarta.

Kanmani P, Kumar RS, Yuvaraj N, Paari KA, Pattukumar V, dan Arul V. 2010. Comparison of Antimicrobial Activity of Probiotic Bacterium *Streptococcus phocae* P180, *Enterococcus faecium* MC13 and *Carnobacterium divergens* Against Fish Pathogen. *World Journal of Dairy and Food Sciences*. 5(2):145-151.

Lay BW. 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*. PT. Raja Grafindo Persada, Jakarta.

Marlina. 2008. Identifikasi Bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dengan Metode BIOLOG dan Deteksi Gen *ToxR* nya Secara PCR. *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi*. 13(1):11-17.

Marzouk MS, Moustafa MM, Nermeen, and Mohamed M. 2008. The Influence of Some Probiotic on The Growth Performance and Intestinal Microbial Flora of *O. NILOTICUS*. *International*

Symposium on Tilapia in Aquaculture.
1059-1071

Oxoid. 2005. *Microbact™ Gram Negatif Identification System.* Oxoid Ltd, London.

Rodriguez LA, Gallardo CS, Acosta F, Nieto TP, Acosta B, dan Real F. 1998. *Hafnia alvei* as an Opportunistic Pathogen Causing Mortality in Brown Trout, *Salmo trutta* L.. *Journal of Fish Diseases.* 21: 365-369.

Santoso J, Setyaningsih I, dan Herlijoso C. 1997. Perubahan Kandungan Asam Lemak Omega-3 pada Pindang Ikan Kembung (*Rastrelliger* sp.) Selama Penyimpanan. *Buletin Teknologi Hasil Perikanan.* 3.

Sudarsono A. 2008. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri pada Ikan Laut dalam Spesies Ikan Gindara (*Lepidocibium flavobronneum*). *Skripsi.* Bogor: Institut Pertanian Bogor.

Suryani Y, Astuti, Oktavia B, dan Umniyati S. 2010. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat dari Limbah Kotoran Ayam Sebagai Agensi Probiotik dan Enzim Kolesterol Reduktase. *Prosiding Seminar Nasional Biologi.* 138-147

Yulinery T, Yulianto E, dan Nurhidayat N. 2006. Uji Fisiologis Probiotik *Lactobacillus* sp. Mar 8 Yang Telah Dienkapsulasi dengan Menggunakan *Spray Dryer* Untuk Menurunkan Kolesterol. *Jurnal Biodiversitas.* 7(2): 118-122.

Yusuf RW. 2009. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Gram Negatif pada Luka Ikan Maskoki (*Carassius auratus*) Akibat Infeksi Ektoparasit *Argulus* sp.. *Skripsi.* Surabaya: Universitas Erlangga.

Zamroni A, Suwarso, dan Mukhlis NA. 2008. Biologi Reproduksi dan Genetik Populasi Ikan Kembung (*Rastrelliger brachysoma*, Famili Scombridae) Di Pantai Utara Jawa. *Jurnal Perikanan Indonesia.* 14: 215-226.