



## Pengaruh suplementasi *Bacillus* sp. melalui perifiton terhadap jumlah total mikroba intestinal dan gambaran darah ikan gurami (*Osphronemus gouramy*)

KHALWAN, AGUS IRIANTO, FARIDA NUR RACHMAWATI

---

### Alamat korespondensi:

Laboratorium Mikrobiologi Fakultas  
Biologi Universitas Jenderal  
Soedirman Purwokerto  
Jl. Dr. Soeparno No. 63 Grendeng  
Purwokerto 53122  
Tel. : +62-281 638794  
Fax.: +62-281 631700  
e-mail: a\_irianto2@yahoo.com

Manuskrip diterima: 8 November  
2012. Revisi disetujui: 28 November  
2012.

*Khalwan, Irianto A, Rachmawati FN. 2012. Effect of Bacillus sp. supplementation through periphyton to total blood profile and intestinal microbial of common carp (Osphronemus gouramy). Bioteknologi 9: 35-40.* Fish is a nutritious food which has high demand in Indonesia. Therefore, increasing fish production is needed. Fish farming faces constraints due to high feed price and diseases. Feed requirements could reach 60-70% of the fish production cost. However, fish infectious diseases have significant effect on profit gain for fish farmers. To overcome these problems, it is necessary to find an alternative of natural food which does not harm to the environment and improve the immunity of fish by utilizing biofilms that supplemented with beneficial bacteria. Supplementation of beneficial bacteria is expected to enrich the composition of periphyton and function as decomposer and help the digestibility of feed through enzymatic activity and stimulate the immune response e.g. through increasing the number and activity of kidney macrophages and increasing white blood cells. Probiotic bacteria used in this study was *Bacillus* sp. Experimental design used in this study to determine the effect of supplementation of *Bacillus* sp. and length of time of periphyton biofilm administration to intestine microorganism and blood profile of giant gouramy. This research used Split Plot Design (SPD). Data were analyzed using analysis of variance (ANOVA). The results showed that the total number of intestinal microbial populations and the total number of leukocytes among fish fed with periphyton supplemented and not supplemented with *Bacillus* sp. had no significant differences, while the length of periphyton biofilm supplementation had significant effect. Feeding with periphyton biofilm supplemented with *Bacillus* sp. for 21 days had the best response to giant gouramy immune based on the blood profile.

**Keywords:** *Bacillus*, blood profile, intestinal microbial, periphyton biofilm

*Khalwan, Irianto A, Rachmawati FN. 2012. Pengaruh suplementasi Bacillus sp. melalui perifiton terhadap jumlah total mikroba intestinal dan gambaran darah ikan gurami (Osphronemus gouramy). Bioteknologi 9: 35-40.* Ikan merupakan bahan pangan bernilai nutrisi tinggi yang saat ini diminati masyarakat, sehingga memerlukan peningkatan produksi. Tetapi, budidaya ikan menghadapi kendala berupa harga pakan yang tinggi dan serangan penyakit. Kebutuhan pakan dapat mencapai 60-70% ongkos produksi. Adapun penyakit ikan terbukti sering menyebabkan petani mengalami kerugian. Untuk mengatasi kedua masalah tersebut, maka perlu alternatif budidaya salah satunya adalah pengembangan pakan alami yang tidak merugikan lingkungan tetapi memberikan keuntungan pada budidaya ikan, salah satunya adalah penggunaan biofilm yang disuplementasi dengan bakteri menguntungkan. Suplementasi bakteri diharapkan dapat memperkaya komposisi perifiton dan meningkatkan fungsinya sebagai dekomposer, serta membantu meningkatkan pencernaan pakan melalui aktivitas enzimatik dan menstimulasi respon imun ikan antara lain dengan meningkatkan jumlah dan aktivitas makrofag ginjal dan meningkatkan sel darah putih. Probiotik yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *Bacillus* sp. Penelitian ini dilakukan secara eksperimen untuk menentukan pengaruh suplementasi dan lama pemberian biofilm perifiton terhadap mikroorganisme intestinum dan gambaran darah ikan gurami. Penelitian ini menggunakan rancangan Split Plot Design (SPD). Data dianalisis menggunakan analisa varian (ANAVA). Hasil menunjukkan bahwa jumlah total mikroorganisme intestinum dan jumlah total lekosit ikan yang diberi pakan biofilm perifiton dengan dan tanpa *Bacillus* sp. tidak menunjukkan perbedaan nyata, sedangkan lama waktu pemberian biofilm perifiton yang disuplementasi *Bacillus* sp. selama 21 hari menunjukkan respon imunitas terbaik didasarkan pada gambaran darahnya.

**Kata kunci:** *Bacillus*, gambaran darah, mikroorganisme intestinal, biofilm perifiton

## PENDAHULUAN

Budidaya ikan pada umumnya dilakukan dengan padatan jumlah tinggi melebihi kondisi normal di lingkungan bebas. Hal ini akan meningkatkan stres yang memicu munculnya penyakit yang disebabkan oleh bakteri maupun virus (Hastuti 2007). Selain itu, harga bahan baku pakan yang semakin meningkat, mendorong upaya pencarian pakan alternatif salah satunya melalui pemberian pakan alami (Haetami et al. 2008). Untuk mengatasi hal tersebut maka perlu mencari alternatif pakan secara mandiri dan tidak merugikan lingkungan dengan cara memanfaatkan biofilm perifiton.

Permasalahan kesehatan ikan, nutrisi dan efisiensi pakan juga dapat diatasi dengan probiotik. Menurut Tangko et al. (2007), penggunaan probiotik dalam bidang akuakultur bertujuan untuk menjaga keseimbangan mikroba dan pengendalian patogen dalam saluran pencernaan, dan lingkungan perairan melalui proses biodegradasi. Suplementasi mikroorganisme probiotik diharapkan dapat memperkaya komponen penyusun perifiton dan berfungsi sebagai dekomposer dan membantu pencernaan pakan melalui aktivitas enzimatisnya dan menstimulasi respon imun antara lain melalui peningkatan jumlah dan aktivitas makrofag ginjal serta meningkatkan sel darah putih (Sugita et al. 1991; Irianto dan Austin 2002).

Potensi biofilm perifiton sebagai pakan alami dan informasi yang terbatas mengenai peningkatan kualitas nutrisi biofilm perifiton melalui pemberian bakteri probiotik menjadi alasan dilakukan penelitian mengenai pengaruh pakan perifiton yang disuplementasi *Bacillus* sp. terhadap total populasi mikroba intestinal dan gambaran darah ikan gurami. Secara umum penelitian ini memiliki tujuan jangka panjang berupa pengembangan inovasi teknologi perbaikan kualitas biofilm perifiton untuk pakan ikan sehingga mampu mendukung pengembangan akuakultur ramah lingkungan, mandiri (*self sufficient*) dan berkelanjutan. Tujuan khususnya yaitu mengetahui pengaruh pemberian biofilm perifiton yang disuplementasi probiotik sebagai pakan ikan alami terhadap total mikroba intestinal dan gambaran darah ikan gurami. Bakteri probiotik yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Bacillus* sp..

## BAHAN DAN METODE

### Peremajaan kultur

Kultur *Bacillus* sp. dari *deep-freezer* diremajakan dengan cara menginokulasikan pada tabung reaksi berisi media TSB. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 28-30°C selama 1x24 jam, kemudian ditanam pada media TSA menggunakan teknik goresan. Tahapan berikutnya adalah konfirmasi karakter mikroba *Bacillus* sp. Pengujian dilakukan berdasarkan uji biokimiawi (kemampuan fermentasi gula-gula, uji motilitas, uji katalase, uji oksidase) dan morfologi untuk identifikasi kultur mikroorganisme unggulan (Lay 1994).

### Persiapan biofilm perifiton yang disuplementasi *Bacillus* sp.

Kolam tanah yang digunakan untuk produksi biofilm sebelum digunakan dikeringkan, dicangkul dasarnya dan diolah dengan pengapuran dan pemupukan. Pemupukan dilakukan dengan pupuk kandang, sebanyak 2,5 kg/m<sup>2</sup> (Irianto dan Ryandini 2009). Hal tersebut dilakukan untuk menumbuhkan pakan alami berupa perifiton yang akan menyusun biofilm perifiton. Kolam ditambahkan kapur sebanyak 1 kg/m<sup>2</sup> untuk menjaga kestabilan pH air (Khairul dan Khiruman 2003). Kolam diisi air setinggi 75 cm dan dibiarkan menggenang dengan cara menutup pintu pemasukan dan pengeluaran air. Selanjutnya dilakukan penebaran bakteri *Bacillus* sp. kedalam kolam dengan konsentrasi akhir pada air kolam sebesar 10<sup>6</sup> sel/mL. Kepadatan bakteri yang akan ditebar ke kolam dihitung dengan menggunakan Rumus berikut:

$$V_{\text{sampel}} \times C_{\text{sampel}} = V_{\text{kolam}} \times C_{\text{kolam}}$$

$V_{\text{sampel}}$  = volume sampel yang akan ditebar

$C_{\text{sampel}}$  = konsentrasi kepadatan bakteri pada sampel (dihitung dengan metode TPC (*Total Plate Count*))

$V_{\text{kolam}}$  = volume kolam

$C_{\text{kolam}}$  = konsentrasi bakteri pada kolam

Bambu dengan panjang 100 cm ditanam, luas permukaan tonggak bambu yang terendam air setara dengan 60% luas permukaan kolam (12 tonggak bambu per m<sup>2</sup>). Air kolam dibiarkan statik tanpa air masuk dan keluar selama 7 hari untuk memberikan kesempatan terbentuknya biofilm perifiton yang mengandung *Bacillus* sp.

### Ujiantang ikan perlakuan dengan bakteri patogen

Pengujian ketahanan hidup dilakukan dengan uji tanggang menggunakan bakteri patogen *Aeromonas hydrophila*. Setelah dipelihara pada kolam selama 7 hari, 10 ekor ikan diambil dan diuji tanggang. Selanjutnya pengambilan ikan untuk uji tanggang dilakukan setiap 7 hari hingga hari ke 21. Sebagai pembanding, digunakan ikan gurami yang dipelihara pada kolam tanpa suplementasi *Bacillus* sp. Uji tanggang dilakukan dengan penyuntikan *A. hydrophila* pada level infeksi (10<sup>6</sup> sel/mL), kemudian ikan dipelihara hingga satu minggu kemudian. Setiap perkembangan penyakit dan kematian dicatat.

### Pengambilan sampel dan preparasi sampel darah putih (Salasia et al. 2001; Wulangi 1993)

Pengambilan sampel darah dilakukan setiap satu minggu dari masing-masing unit perlakuan. Darah diambil dari 3 ekor ikan sebagai sampel sehingga diamati secara komposit (gabungan dari 3 ekor ikan). Darah ikan diambil dari vena kaudalis, dengan cara memotong bagian ekor ikan sampel dengan menggunakan pisau bedah dari ventral ke arah dorsal sehingga darah dapat mengalir lebih lancar. Darah dihisap dengan hati-hati menggunakan spuit yang terlebih dahulu dibasahi menggunakan heparin kemudian darah dimasukkan kedalam botol sampel darah yang telah diisi dengan larutan EDTA sebanyak 5µL untuk setiap 0,5 mL darah. Apabila darah yang diambil melalui vena kaudalis jumlahnya kurang maka, pengambilan darah dilakukan melalui jantung.

Darah yang telah ditampung kemudian dihisap dengan menggunakan pipet leukosit hingga pada angka 0,5. Larutan *Turk* dituangkan ke dalam tabung dan dihisap hingga angka 11. Pipa karet dilepaskan dari pipet, kemudian dipegang kedua ujungnya dengan ibu jari dan telunjuk, selanjutnya dikocok selama 2 menit. Satu hingga dua tetes pertama sampel dibuang kemudian tetesan berikutnya digunakan untuk perhitungan pada bilik hitung, dengan cara meneteskan pada sumuran pada bilik hitung haemositometer, kemudian sampel diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali.

Penghitungan jumlah leukosit dilakukan setelah pengenceran 20 x menggunakan rumus sebagai berikut.

$$\text{Jumlah leukosit per mm}^3 = \frac{L \times 160 \times 20}{16} = 200 L$$

L = Jumlah leukosit  
20 x = Pengenceran  
16 = Jumlah bujur sangkar yang dihitung  
1/160 = Volume masing-masing bujur sangkar

### Preparasi apusan sel darah pada Glass Slide

Preparasi apusan sel darah dengan metode Giemsa dilakukan dengan cara sebagai berikut. Bagian ujung gelas objek dibersihkan dari kotoran dan lemak kemudian diteteskan satu tetes darah ikan. Gelas objek yang lain (dipilih yang tepinya rata) digunakan untuk membuat preparat apus. Preparat difiksasi dengan metanol ± 5 menit. Sisa metanol dibuang dan preparat diwarnai dengan larutan *Giemsa* yang telah diencerkan (larutan *Giemsa* dibuat dengan cara menambahkan 20 tetes larutan *Giemsa Stock* ke dalam 5 mL akudes) selama ± 20 menit. Preparat dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan (Wulangi 1993).

Preparat yang sudah kering kemudian diperiksa menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali, kemudian dihitung persentase jenis leukosit, yaitu monosit, neutrofil, basofil, dan limfosit.

### Perhitungan jumlah sel *Bacillus* sp. dan total populasi mikroba intestinal dengan metode Total Plate Count (TPC)

Metode *Total Plate Count* (TPC) (Lay 1994) diterapkan untuk menghitung jumlah populasi *Bacillus* sp. dan total populasi mikroba intestinal pada perlakuan yang diberikan. Sebanyak 1 g sampel intestin di *macerasi* dan diencerkan dalam 9 mL akuades steril, dikocok hingga homogen dan dilakukan pengenceran kembali hingga diperoleh 6 seri pengenceran. Dua seri pengenceran terakhir diambil sebanyak 0,1 mL dan ditanam *duplo* pada medium TSA untuk *Bacillus* sp. sedangkan total populasi mikroba intestinal ditanam *duplo* pada medium PCA dan untuk kontrol ditanam *duplo* pada medium PCA dengan metode *spread plate*. Hasil *spread plate* diinkubasi selama 2x24 jam pada suhu 30°C, setelah 2x24 jam jumlah koloni dihitung dengan menggunakan *colony counter*. Jumlah sel dinyatakan dalam CFU/mL.

$$\text{Jumlah sel} = \frac{\text{Jumlah koloni cawan 1,2,3 ... dst} \times 1/\text{fp}}{\text{Jumlah cawan}}$$

fp = faktor pengenceran

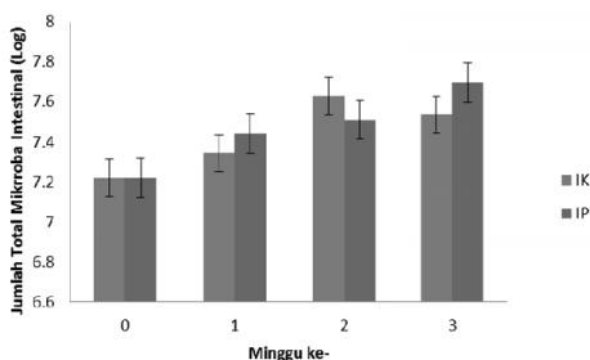
### Rancangan percobaan dan analisis data

Penelitian dilaksanakan secara eksperimental, menggunakan *Split Plot Design* (SPD) dengan menggunakan dua kolom (suplementasi dan tanpa suplementasi *Bacillus* sp.) sebagai *Main Plot*nya sedangkan lama (0, 1, 2, dan 3 minggu) pemberian biofilm perifiton sebagai *Sub Plot*nya dan tiga kali ulangan. Menggunakan analisis ragam (ANOVA) satu arah, Hasil dengan nilai  $p < 0.05$  dilanjutkan dengan Uji beda Nyata Terkecil (BNT) untuk mengetahui perbedaan lama pemberian *Bacillus* sp. terhadap total populasi mikroba intestinal dalam peningkatan respon imun ikan gurami.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Jumlah total populasi mikroba intestinal

Berdasarkan hasil pengamatan jumlah mikroba intestinal tertinggi terjadi pada perlakuan pemberian biofilm perifiton yang disuplementasi *Bacillus* sp. selama 3 minggu (21 hari) dan berikut ini jumlah total populasi mikroba intestinal secara berurutan  $1,7 \times 10^7$  cfu/mL;  $2,8 \times 10^7$  cfu/mL;  $3,3 \times 10^7$  cfu/mL;  $5,2 \times 10^7$  cfu/mL, sedangkan tanpa suplementasi terjadi pada pemberian biofilm perifiton selama 2 minggu (14 hari) dan secara berurutan  $1,7 \times 10^7$  cfu/mL;  $2,2 \times 10^7$  cfu/mL;  $4,3 \times 10^7$  cfu/mL;  $3,9 \times 10^7$  cfu/mL.



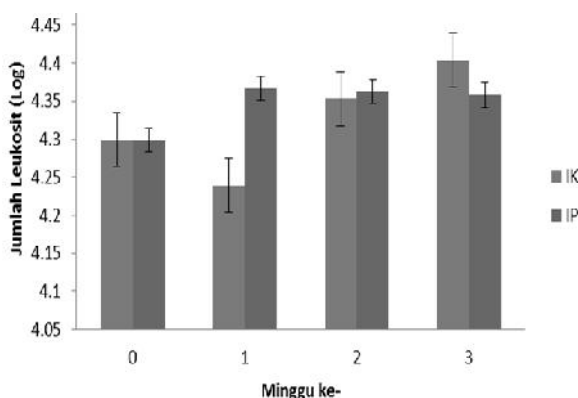
**Gambar 1.** Total populasi mikroba intestinal berdasarkan lama pemberian biofilm perifiton. Keterangan: IP = Ikan yang diberikan biofilm perifiton yang disuplementasi *Bacillus* sp.; IK = Ikan yang diberikan biofilm perifiton tanpa disuplementasi *Bacillus* sp.

Hasil analisis menunjukkan bahwa jumlah total populasi mikroba intestinal pada kolam yang disuplementasi maupun tanpa disuplementasi *Bacillus* sp. tidak berbeda nyata

( $P < 0,05$ ) akan tetapi, berbeda nyata ( $P > 0,05$ ) pada perlakuan waktu terhadap jumlah total populasi mikroba intestinal. Peningkatan jumlah mikroba intestinal dalam saluran pencernaan karena biofilm perifiton merupakan komunitas mikroba yang ada di lingkungan perairan secara langsung atau tidak langsung masuk ke dalam saluran pencernaan ikan melalui proses memakan. Untuk mengetahui perlakuan waktu mana yang mempunyai pengaruh sangat nyata terhadap jumlah total populasi mikroba intestinal, maka dilakukan uji beda nyata terkecil (BNT) untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan. Hasil uji beda nyata terkecil terhadap jumlah total populasi mikroba intestinal yang diberikan perlakuan waktu menunjukkan bahwa terjadi peningkatan jumlah mikroba intestinal.

### Jumlah total leukosit

Hasil pengamatan jumlah total leukosit ikan gurami pada penelitian ini dapat dilihat bahwa rata-rata total leukosit pada kolam tanpa suplementasi *Bacillus* sp. secara berurutan tiap minggu yaitu  $\pm 2,0 \times 10^4$  sel/mm<sup>3</sup>;  $\pm 1,7 \times 10^4$  sel/mm<sup>3</sup>;  $\pm 2,3 \times 10^4$  sel/mm<sup>3</sup>;  $\pm 2,5 \times 10^4$  sel/mm<sup>3</sup>; dan kolam dengan suplementasi *Bacillus* sp. secara berurutan tiap minggu yaitu  $\pm 2,0 \times 10^4$  sel/mm<sup>3</sup>;  $\pm 2,3 \times 10^4$  sel/mm<sup>3</sup>;  $\pm 2,3 \times 10^4$  sel/mm<sup>3</sup>;  $\pm 2,3 \times 10^4$  sel/mm<sup>3</sup>, selanjutnya ditampilkan pada Gambar 2. terlihat perbedaan antara jumlah total leukosit ikan pada kolam yang disuplementasi dan ikan pada kolam tanpa suplementasi *Bacillus* sp.



**Gambar 2.** Total leukosit berdasarkan lama pemberian biofilm perifiton. Keterangan: IP = Ikan yang diberikan biofilm perifiton yang disuplementasi *Bacillus* sp.; IK = Ikan yang diberikan biofilm perifiton tanpa disuplementasi *Bacillus* sp.

Dari Gambar 2. Diketahui bahwa jumlah total leukosit ikan pada kolam tanpa *Bacillus* sp. dari awal hingga akhir penelitian terus

mengalami peningkatan hal ini menunjukkan ikan tersebut mengalami kondisi yang kurang baik karena adanya jamur parasit yang menjangkiti ikan tersebut. Melihat dari cirinya ikan pada kolam tanpa suplementasi *Bacillus* sp. ternyata terinfeksi *Saprolegnia* sp.. Dalam kasus ini, ikan yang dipiara menunjukkan peningkatan jumlah total leukosit. Menurut Bruno dan Wood (1999) infeksi oleh *Saprolegnia* sp. merupakan satu diantara beberapa permasalahan yang dijumpai baik pada ikan maupun telurnya. Penyakit akibat infeksi *Saprolegnia* sp. ini ditandai dengan adanya lesi yaitu kerusakan sel-sel mukosa dan peradangan. Menurut Johnny et al. (2005) meningkatnya jumlah leukosit yang berfungsi sebagai sel fagosit mempunyai kemampuan intrinsik untuk mengikat mikroorganisme secara langsung dan dalam kerjanya sel fagosit berinteraksi dengan komplemen dan sistem kekebalan spesifik.

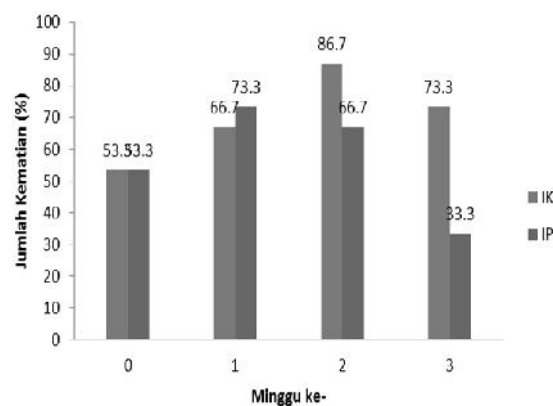
Sebaliknya, ikan pada kolam yang disuplementasi *Bacillus* sp. mengalami peningkatan jumlah leukosit pada minggu ke-1 dan turun pada minggu berikutnya. Pada minggu ke-1 ikan beradaptasi dengan lingkungan yang baru sehingga pada ikan kolam yang disuplementasi merespon *Bacillus* sp. sebagai benda asing sehingga jumlah leukosit meningkat, tetapi pada minggu ke-2 dan ke-3 *Bacillus* sp. tidak lagi dianggap sebagai benda asing sehingga respon tanggap berupa peningkatan jumlah sel darah putih tidak terjadi. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Guyton (1993) bahwa leukosit merupakan salah satu komponen sistem kekebalan tubuh yang berperan secara fagositik, yaitu mencerna mikroorganisme atau benda asing yang telah masuk ke dalam tubuh. Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian biofilm perifiton yang disuplementasi *Bacillus* sp. memberikan efek terhadap peningkatan jumlah leukosit.

### Ragam leukosit

Hasil analisis variansi persentase ragam leukosit ikan gurami menunjukkan bahwa tidak berpengaruh ( $p > 0,05$ ) terhadap persentase limfosit, monosit, neutrofil, dan basofil baik yang disuplementasi maupun tanpa suplementasi *Bacillus* sp.. Perlakuan waktu terhadap persentase limfosit dan basofil sehingga tidak perlu dilakukan uji beda nyata terkecil (BNT), sedangkan monosit dan neutrofil menunjukkan pengaruh yang nyata ( $p < 0,05$ ) dan dilakukan uji beda nyata terkecil (BNT).

### Uji tantang ikan dengan bakteri patogen

Uji tantang yang dilakukan dengan cara disuntikkan *Aeromonas hydrophila* ke tubuh ikan dengan kepadatan  $10^6$  sel/mL. Tujuan dari uji tantang ini adalah untuk mengetahui ketahanan ikan jika terpapar bakteri patogen yang disuntikkan kedalam tubuh ikan. *A. hydrophila* bersifat patogen oportunistis, sering menimbulkan wabah penyakit dengan tingkat kematian tinggi pada waktu singkat (1-2 minggu), serangannya bersifat sistemik yaitu disamping menyerang organ luar juga menyerang organ dalam (Taufik 2002).



**Gambar 3.** Hasil rata-rata uji tantang ikan gurami dengan bakteri patogen (*A. hydrophila*). Keterangan: IP = Ikan yang diberikan biofilm perifiton dengan suplementasi *Bacillus* sp.; IK = Ikan yang diberikan biofilm perifiton tanpa suplementasi *Bacillus* sp.

Gambar 3. menunjukkan bahwa suplementasi *Bacillus* sp. dapat menurunkan persentase jumlah kematian ikan yang disuntik bakteri patogen. Sedangkan pada ikan dari kolam tanpa suplementasi *Bacillus* sp., persentase kematian ikan cenderung meningkat walaupun pada minggu ke-3 turun. Hal ini menunjukkan bahwa suplementasi *Bacillus* sp. mampu meningkatkan respon imun ikan gurami walaupun gambaran darah tidak menunjukkan hasil yang berbeda secara signifikan.

### KESIMPULAN

Pemberian pakan biofilm perifiton yang disuplementasi *Bacillus* sp. tidak mampu mempengaruhi jumlah total populasi mikroba intestinal. Akan tetapi, pada perlakuan waktu mampu mempengaruhi terhadap jumlah total populasi mikroba intestinal dan respon imunitas pada ikan gurami dilihat dari jumlah leukosit

dan persentase ragam leukosit. Pemberian pakan alami biofilm perifiton yang disuplementasi *Bacillus* sp. selama 21 hari menunjukkan respon paling baik terhadap kekebalan tubuh ikan gurami ditinjau dari gambaran darah, serta persentase kematian ikan pada uji tantang dengan bakteri patogen *Aeromonas hydrophila*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aly SM, Ahmed YA, Ghareeb, AA, Mohamed MF. 2008. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* to challenge infections. Fish and Shellfish Immunol 25:128-136.
- Bruno DW, Wood BP. 1999. *Saprolegnia* and other Oomycetes. fish diseases and disorders, viral, bacterial and fungal infections., CABI Publishing, Wallingford, Owon.
- Hadioetomo, RS. 1990. Mikrobiologi Dasar dalam Praktek: Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium. Gramedia. Jakarta
- Guyton AC, Hall JE. 1993. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran Edisi 9 (terjemahan)*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Haetami K, Abun, Mulyani Y. 2008. Studi Pembuatan Probiotik BAS (*Bacillus licheniformis*, *Aspergillus niger* dan *Sacharomices cereviseae*) sebagai *Feed Supplement* serta Implikasinya terhadap Pertumbuhan Ikan Nila Merah. Laporan Penelitian. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Padjadjaran. Bandung.
- Hastuti DS. 2007. Evaluation of non-specific defence of *Tilapia (Oreochromis sp.)* injected with LPS (Lipopolysaccharides) of *Aeromonas hydrophilla*. Jurnal Protein 14: 79-84.
- Irianto A, Austin B. 2002. Use of probiotic to control furunculosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). J Fish Diseases 25: 333-342.
- Irianto A, Hernayanti, Iriyanti N. 2006. Pengaruh suplementasi probiotik A3-51 terhadap derajat imunitas *Oreochromis niloticus* didasarkan pada angka kuman pada ginjal setelah uji tantang dengan *Aeromonas hydrophila* dan *Aeromonas salmonicida achromogenes*. Jurnal Perikanan 8: 144-152.
- Irianto A Ryandini D. 2009. Manipulasi biofilm perifiton menggu,nakan *Bacillus* spp. dan efek imunostimulasinya pada gurami sebagai upaya pengendalian penyakit infeksi bakterial. Laporan Penelitian Fundamental. Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman. Purwokerto.
- Johnny, F, Giri NA, Suwirya K, Reza D. 2005. Pengaruh vitamin B dalam pakan terhadap sistem kekebalan benih ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis*. Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia 2:73-79.
- Lay BW. 1994. Analisis Mikrobiologi di Laboratorium. PT. Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Liu KF, Chiu CH, Shiu YL, Cheng W, Liu CH. 2010. Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance and immune status of white shrimp *Litopenaeus vannamei* larvae. Fish Shellfish Immunol 28: 837-844.
- Mohamed HM, Nahla AGAR. 2011. Pathological evaluation of probiotic, *Bacillus subtilis*, against *Flavobacterium columnare* in *Tilapia nilotica (Oreochromis niloticus)* fish in Sharkia Governorate, Egypt. J Amer Sci 7: 244-256.
- Moriarty DJW. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. Aquaculture 164: 351-358.
- Nayak SK, Swain P, Mukherjee SC. 2007. Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major carp. Fish Shellfish Immunol 23: 892-896.
- Parvathi A, Krishna K, Jose J, Neetha J, an Santha. 2009. Biochemical and molerculer characterization of *Bacillus pumilus* ilolated from coastal envirotnmen in Cochlin. Braz J Microbiol 40: 269-275.
- Randelli E, Buonocore F, Scapiliati G.2008.Cell markers and determinants in fish immunology. Fish Shellfish Immunol 25: 326-240.
- Salasia SIO, Sulanjari D, Ratnawati A. 2001. Studi Hhematologi ikan air tawar. Jurnal Biologi 12: 10-23.
- Sugita H, Miyajima C, Deguchi Y. 1991. The vVitamin B<sub>12</sub>-producing ability of the intestinal microflora of freshwater fish. Aquaculture 92: 267-276.
- Tangko AM, Mansyur A, Reski. 2007. Penggunaan probiotik pada pakan pembesaran ikan bandeng dalam karamba jaring apung di laut. Pusat Riset Perikanan Budidaya. Jakarta. Jurnal Riset Akuakultur 2: 33-40.
- Taufik P. 2002. Ketahanan beberapa strain ikan gurame *Osphronemus gouramy* Lac. terhadap patogen *Aeromonas hydrophila*. Sains Akuatik 5:16-19.
- Thomson FB, Abreu PC, Wasielesky W. 2002. Importance of biofilm for water quality and nourishment in intensive shrimp culture. Aquaculture 203: 263-278.
- Usharani B, Muthuraj M. 2010. Production and characterization of protease enzyme from *Bacillus laterosporus*. African J Microbiol Res 4: 1057-1063.
- WangYC, Chang PS, Chen HY. 2008. Differential time series expression of immune related genes of Pacific white shrimp in response to dietary inclusion of  $\alpha$  1, 3-glucan. Fish Shellfish Immunol 24: 113-121.
- Wulangi KS. 1993. Prinsip-prinsip fisiologi hewan. Proyek Pembinaan Tenaga Kependikan Pendidikan Tinggi. Biologi FMIPA ITB. Bandung.