

## MIKROFLORA SALURAN PENCERNAAN IKAN GURAME (*Osphronemus gouramy* Lacepede)

### Intestinal Microflora of Giant Gouramy (*Osphronemus gouramy* Lacepede)

Siti Aslamyah<sup>1</sup>, Hasni Y. Azis<sup>2</sup>, Sriwulan<sup>3</sup>, Komang G. Wiryawan<sup>4</sup>

<sup>1,2,3</sup> Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan, Universitas Hasanuddin,

<sup>4</sup> Departemen Nutrisi Fak. Peternakan Intitut Pertanian Bogor, Bogor 16680

#### ABSTRACT

*The objectives of this experiment was to find out micro flora that have proteolytic and amylolytic activity in the intestine giant gouramy. Isolated in aerobe and anaerobe condition eighth Trypticase Soy Broth (TSB, Merck) as a culture medium added NaCl 1% with casein as an energy source for proteolytic and starch for amylolytic, pH 7 and incubation temperature 29°C. Isolate purified is done with 10<sup>2</sup> to 10<sup>10</sup> dilution series, than transfer to Trypticase Soy Agar (TSA). Identified pure isolate in a physiology and biochemistry manner. The intestine giant gouramy obtained 12 isolate consist 4 isolate aerob proteolytic microbe (*Staphylococcus* sp., *Clostridium* sp., *Bacillus* sp. and *Moraxella* sp.), 2 anaerob proteolytic microbe isolate (*Nitrococcus* sp. dan *Aeromonas* sp.), 3 aerob amylolytic microbe isolate (*Mycobacterium* sp. *Lactobacillus* sp. dan *Aeromonas* sp.), and 3 anaerob amylolytic microbe isolate (*Carnobacterium* sp., *Citrobacter* sp. and *Streptococcus* sp.).*

*Key words: giant gouramy, microflora, microbe proteolytic, amylolytic, aerob, anaerob*

#### PENDAHULUAN

Ikan gurame (*Osphronemus gouramy*, Lacepede) adalah ikan asli Indonesia (Bardach *et al.*, 1972), memiliki nilai ekonomis cukup tinggi, berukuran besar, dan berpotensi tumbuh cepat. Kemampuan pertumbuhannya telah dibuktikan melalui hasil penelitian kebutuhan nutrisi pakan ikan gurame oleh beberapa peneliti (Mokoginta *et al.*, 1996 dan 1999; Mubin, 1999; Jusadi *et al.*, 2000; dan Suprayudi *et al.*, 2000). Dengan demikian, budidaya ikan gurame berpotensi untuk dikembangkan.

Berdasarkan kebiasaan makanannya, ikan gurame adalah ikan omnivora yang bertendensi herbivora. Oleh karena itu, di alam ikan gurame dapat mengkonsumsi sumber pakan yang berasal dari tumbuh-tumbuhan. Disamping itu untuk memenuhi kebutuhan proteinnya ikan gurame juga dapat memanfaatkan detritus yang berasal dari dasar perairan. Hasil penelitian Mason (1975); Wiernicki (1984); Jones (1990); Brown (1995) dalam Xue *et al.* (1999) menunjukkan bahwa detritus banyak mengandung jasad renik dan mikroorganisme yang ikut berperan dalam menyumbangkan enzim pencernaan eksogen untuk mendegradasi nutrisi pakan yang dikonsumsi oleh ikan. Jasad renik dan mikroorganisme tersebut juga merupakan sumber nutrisi tambahan bagi ikan.

Jasad renik dan mikroorganisme yang termakan oleh ikan akan membentuk koloni dalam saluran pencernaan dan disebut dengan mikroflora. Mikroflora adalah mikroorganisme yang secara alamiah menghuni saluran pencernaan makhluk hidup. Mikroflora terdiri atas berbagai mikroba dalam jumlah besar, dengan aktivitas dan kapasitas

---

#### <sup>1)</sup> Korespondensi:

Jurusan Perikanan FIKP UNHAS

Jl. Perintis Kemerdekaan Km.10 Tamalanrea 90245

Telp. (0411) 586 814

metabolik yang sangat beragam, serta yang dapat memberi pengaruh positif maupun negatif pada fungsi fisiologis saluran pencernaan. Pelczar dan Chan (1988) mengemukakan bahwa mikroflora asli saluran pencernaan mempunyai hubungan mutualisme dengan inangnya, yaitu memanfaatkan inang sebagai tempat hidupnya. Keuntungan bagi inang adalah umumnya mikroba memakan sisa atau menggunakan bahan buangan, banyak bakteri usus dapat mensintesis vitamin, mensekresi enzim, dan membantu pencernaan nutrisi, dan kehadiran mikroba asli cenderung menekan pertumbuhan bakteri patogen sehingga dapat melindungi inang terhadap penyakit serta merangsang fungsi kekebalan tubuh. Melihat peranan mikroflora yang sangat besar bagi pencernaan dan kesehatan, penelitian untuk mengubah mikroflora saluran pencernaan ke arah yang menguntungkan baik untuk tujuan kesehatan maupun pertumbuhan bagi manusia dan hewan terestrial terutama ruminansia telah banyak dilaporkan. Saat ini telah dibuat suatu produk yang telah dikomersilkan yang disebut dengan istilah “Probiotik”

Penelitian mikroflora pada saluran pencernaan ikan telah banyak dilaporkan (Clarke dan Bauchop, 1977; Das dan Tripathi, 1991; Nakayama *et al.*, 1994; Opuszynski dan Shireman, 1994; Hoshino *et al.*, 1997; Xue *et al.*, 1999; Robertson *et al.*, 2000; Spanggaard *et al.*, 2000; Jankauskiene, 2002; Tae, 2003; Al-Harbi dan Uddin, 2005). Namun demikian, khususnya ikan gurame belum ditemukan. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian mikroflora saluran pencernaan ikan gurame guna menambah informasi tentang mikroflora saluran pencernaan ikan.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia dan Mikrobiologi Nutrisi, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor, selama 3 bulan, mulai bulan Maret sampai Juni 2005.

### Pengambilan Isi Saluran Pencernaan

Pengambilan isi saluran pencernaan ikan gurame sebagai sumber inokulum, dilakukan dengan cara mengeluarkan organ pencernaan (lambung dan usus) setelah ikan gurame fase dewasa dimatikan, organ pencernaan ditimbang dan diukur panjangnya. Saluran pencernaan digerus dan setiap 10 g saluran pencernaan diencerkan dengan 90 mL cairan fisiologis (NaCl 0,85%) steril.

### Isolasi dan Karakterisasi Mikrob

Prosedur isolasi dan karakterisasi mikrob yang mempunyai aktivitas proteolitik dan amilolitik dilakukan dengan metode selektif, yang mengacu pada metode yang dilakukan pada hewan terestrial seperti petunjuk Hungate (1966), serta mengkombinasikannya dengan prosedur isolasi mikrob dari saluran pencernaan ikan seperti metode yang dilakukan oleh Nakayama *et al.* (1994); Hoshino *et al.* (1997); Jankauskiene (2002); dan Tae (2003).

### Kultur Mikrob

Kultur mikrob dilakukan dalam suasana aerob dan anaerob. Untuk menciptakan kondisi anaerob setiap proses kegiatan dialiri gas CO<sub>2</sub> dan tabung disumbat dengan tutup karet. Media kultur yang digunakan adalah Trypticase Soy Broth (TSB, Merck) yang ditambah 1% NaCl. Sebagai sumber energi adalah kasein untuk proteolitik dan pati untuk amilolitik. Sumber inokulum diambil sebanyak 0,5 mL dan diinokulasikan ke dalam 10 mL media cair standar, yaitu TSB ditambah pati dan TSB ditambah kasein. Kultur dibuat secara duplo. Kultur kemudian diinkubasi pada suhu 29°C selama 24 jam agar mikrob

dapat tumbuh. Pertumbuhan mikrob ditandai oleh keruhnya media kultur.

Pengenceran berseri dilakukan dari  $10^{-2}$  sampai  $10^{-10}$  dengan cara mengambil 0,05 mL dari kultur mikrob pada media cair dan dimasukkan ke dalam 4,95 mL media pengencer pertama, selanjutnya dari media pengencer pertama diambil sebanyak 0,05 mL dan dimasukkan ke dalam 4,95 mL media pengencer kedua dan seterusnya sampai media pengencer terakhir.

### **Pemurnian Isolat**

Untuk mendapatkan isolat murni, dari setiap seri pengenceran ditransfer sebanyak 0,1 mL ke dalam media padat, yang terdiri atas campuran TSB, agar dan sumber energinya, dan dikemas dengan menggunakan *role tube technique* untuk suasana anaerob dan menggunakan cawan petri untuk suasana aerob. Sediaan ini diinkubasi kembali pada suhu 29°C selama 24 sampai 48 jam. Koloni mikrob yang tumbuh dipilih berdasarkan perbedaan morfologi (bentuk, ukuran, dan warna koloni). Metode purifikasi dilakukan berulang-ulang dengan teknik dan media yang sama sampai didapatkan koloni mikrob tunggal dan seragam.

Kultur murni selanjutnya diperbanyak atau diperkaya untuk mendapatkan isolat. Sebagian isolat mikrob digunakan sebagai kultur stok dan sebagian lagi dipakai sebagai inokulum pada pengamatan selanjutnya. Pengayaan dilakukan dengan cara menumbuhkan masing-masing isolat ke dalam media yang paling sesuai dengan media hidupnya, kemudian diinkubasi pada suhu 29°C selama 24 jam. Kultur yang didapat siap untuk diawetkan. Pengawetan dilakukan dengan menyimpan isolat-isolat yang telah diperoleh ke dalam media gliserol 80% yang selanjutnya disebut kultur stok. Cara pelaksanaannya adalah tabung Eppendorf kapasitas 1000  $\mu$ L diisi media gliserol 80% kemudian ditambahkan kultur mikrob yang akan diawetkan. Perbandingan kultur dengan gliserol adalah 3:1. Setelah itu, mikrob dalam kultur stok dinonaktifkan dengan cara disimpan dalam freezer - 4°C.

### **Analisis Data**

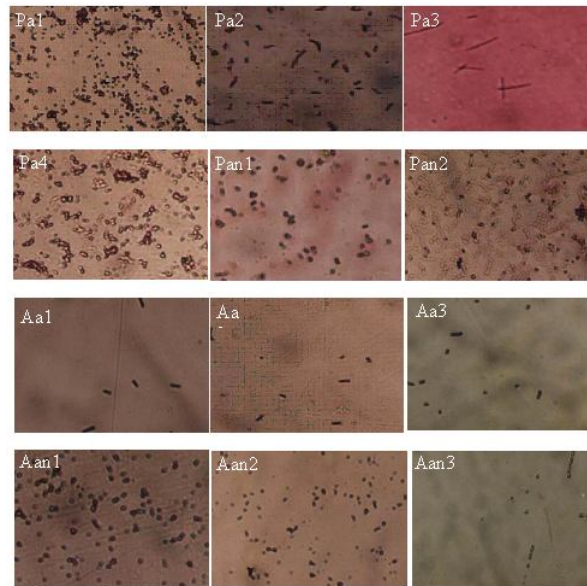
Isolat mikrob yang sudah murni dikarakterisasi secara fisiologis dan biokimia. Data mikrob yang diperoleh dianalisis secara deskriptif, yaitu membandingkannya dengan literatur pendukung dengan menggunakan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994).

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Pada penelitian ini berhasil diisolasi 12 isolat dari saluran pencernaan ikan gurame yang terdiri atas 4 isolat mikrob proteolitik aerob, 2 isolat mikrob proteolitik anaerob, 3 isolat mikrob amilolitik aerob, 3 isolat mikrob amilolitik anaerob. Morfologi koloni isolat dan jenis mikrob berdasarkan identifikasi secara fisiologi dan biokimia menggunakan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994) dapat dilihat pada Tabel 1 dan bentuk isolat dapat dilihat pada Gambar 1.

Tabel 1. Morfologi koloni isolat dan jenis mikroba

Isolat	Karakter Koloni	Pewarnaan Gram	Jenis Mikroba
<b>Proteolitik</b>			
Pa1	Bulat besar, tepi rata, menipis ke tepi, warna krem	Coccus, gram negatif	<i>Staphylococcus</i> sp.
Pa2	Bulat besar tidak beraturan menipis ke tepi, bagian tepi bergerigi dan bagian tengah ada inti, warna bening	Bacil, gram positif	<i>Clostridium</i> sp.
Pa3	Bulat kecil, pinggir rata, warna krem tua	Bacil, gram negatif	<i>Bacillus</i> sp.
Pa4	Bulat sedang, tepi rata, warna krem tua	Cocobacillus, gram negatif	<i>Moraxella</i> sp.
Pan1	Bulat kecil tak beraturan, warna bening	Coccus, gram negatif	<i>Nitrococcus</i> sp.
Pan2	Bulat kecil, menipis ke tepi, bagian tengah ada inti, warna krem	Coccus, gram negatif	<i>Aeromonas</i> sp.
<b>Amilolitik</b>			
Aa1		Bacil, gram positif	<i>Mycobacterium</i> sp.
Aa2	Bulat besar tidak beraturan, tepi bergelombang, warna krem	Bacil, gram positif	<i>Lactobacillus</i> sp.
Aa3	Bentuk tidak beraturan, bagian tengah tebal dengan warna krem tua, menipis ke tepi dengan warna bening	Coccus, gram negatif	<i>Aeromonas</i> sp.
Aan1		Coccus, gram negatif	<i>Carnobacterium</i> sp.
Aan2	Bentuk tidak beraturan dengan warna bening	Coccus, gram positif	<i>Citrobacter</i> sp.
Aan3	Bentuk bintik-bintik tidak beraturan dengan warna krem	Coccus, gram negatif	<i>Streptococcus</i> sp.
	Bulat kecil seperti bintik, warna bening		
	Bulat kecil dengan tepi rata, warna krem		



Gambar 1. Bentuk isolat mikroba proteolitik dan amilolitik yang diisolasi dari saluran pencernaan ikan gurame

**Mikrob proteolitik aerob**

Pa1 : *Staphylococcus* sp..

Pa2 : *Clostridium* sp.

Pa3 : *Bacillus* sp.

Pa4 : *Moraxella* sp.

**Mikrob amilolitik aerob**

Aa1 : *Mycobacterium* sp.

Aa2 : *Lactobacillus* sp .

Aa3 : *Aeromonas* sp.

**Mikrob proteolitik anaerob**

Pan1 : *Nitrococcus* sp.

Pan2 : *Aeromonas* sp.

**Mikrob amilolitik anaerob**

Aan1 : *Carnobacterium* sp.

Aan2 : *Citrobacter* sp.

Aan3 : *Streptococcus* sp.

Mikroflora yang ditemukan pada saluran pencernaan ikan gurame umumnya juga ditemukan pada saluran pencernaan spesies ikan lain dan media budi daya seperti dilaporkan oleh beberapa peneliti (Sakata dan Yuki, 1991; Cipriano *et al.*, 1992; Sugita *et al.*, 1994; Garcia *et al.*, 1997; Rombout *et al.*, 1999; Olsen *et al.*, 2000; Rengpipat *et al.*, 2000; Robertson *et al.*, 2000; Spanggaard *et al.*, 2000; Al-Harbi dan Uddin, 2005). Namun demikian, belum ditemukan laporan tentang jenis mikroba lainnya yang ditemukan pada saluran pencernaan ikan gurame, yaitu mikroba *Clostridium* sp., dan *Mycobacterium* sp. ditemukan pada saluran pencernaan spesies ikan lain. Akan tetapi, jenis mikroba tersebut umumnya ditemukan pada substrat tanah (Pelczar dan Chan, 1988; dan Olsen *et al.*, 2000).

Mikroflora saluran pencernaan ikan gurame seperti halnya mikroba yang ditemukan pada spesies ikan lainnya diduga berasal dari lingkungan budi daya. Mikroba tersebut masuk ke dalam saluran pencernaan bersama dengan pakan yang dimakan. Khususnya ikan gurame, kebiasaannya memakan detritus dari dasar kolam bertujuan untuk mendapatkan jasad renik atau mikroorganisme untuk memenuhi kebutuhan protein dan atau untuk membantu degradasi pakan yang dimakan. Dengan demikian, mikroflora tersebut mempunyai peluang yang besar untuk dijadikan probiotik.

Mikroflora menguntungkan yang ditemukan pada saluran pencernaan ikan gurame adalah *Moraxella* sp., *Bacillus* sp., *Carnobacterium* sp., *Lactobacillus* sp., dan *Streptococcus* sp., Hasil penelitian yang mempertegas hal ini dilaporkan oleh beberapa peneliti (Garcia *et al.*, 1997; Haryanti *et al.*, 1999; Rengpipat *et al.*, 1998, 2000; Rombout

*et al.*, 1999; De Schrijver dan Ollevier, 2000; dan Robertson *et al.*, 2000). Mikrob tersebut berperan sebagai nutrisi tambahan bagi ikan dan atau suplemen dalam kultur pakan alami, yaitu bermanfaat melalui metabolit seperti vitamin B12 dan enzim yang disekresikannya ke dalam medium kultur. Di samping itu, mikrob yang termakan dan masuk ke dalam saluran pencernaan berperan dalam meningkatkan pencernaan nutrisi pakan melalui enzim pencernaan eksogen yang disekresikannya. Peran yang lain adalah kemampuan mikrob menghasilkan senyawa antimikrob sehingga mampu menghambat perkembangan mikro patogen dalam saluran pencernaan ikan maupun media budi daya. Oleh karena itu, mikroflora saluran pencernaan ikan gurame yang terpilih sebagai kandidat probiotik adalah mikrob yang menguntungkan serta dapat menjaga keseimbangan mikroflora dalam saluran pencernaan ikan.

Mikroflora yang telah diisolasi dari saluran pencernaan ikan gurame tidak semuanya menguntungkan bagi ikan dan atau pakan alami ikan. Mikroflora yang merugikan atau mikrob patogen bagi ikan adalah *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Plesiomonas* sp., *Vibrio* sp., dan *Streptococcus* sp. Keberadaan mikrob patogen pada saluran pencernaan ikan dan atau media budi daya dengan populasi yang tinggi sangat merugikan pada usaha budi daya ikan. Hal ini terjadi karena mikrob patogen dapat menimbulkan penyakit dan bahkan kematian bagi organisme budi daya.

Hal penting yang diperlukan mikroflora saluran pencernaan adalah berada dalam keseimbangan, yaitu antara mikrob menguntungkan dan mikrob patogen, serta saling berinteraksi antar-spesies mikrob dalam saluran pencernaan, baik secara antagonistik maupun sinergistik. Interaksi yang terjadi sangat penting di dalam mempertahankan keseimbangan mikroflora saluran pencernaan. Kemampuan mikrob menguntungkan dalam menghambat perkembangan mikrob patogen, menunjukkan kemampuannya untuk mempertahankan keseimbangan mikroflora di dalam saluran pencernaan ikan bandeng. Kemampuan tersebut berhubungan dengan kemampuannya menghasilkan senyawa antimikrob, yaitu peptida yang disintesis dalam ribosom. Suroño (2004) mengemukakan bahwa antimikrob yang dihasilkan mikroflora di antaranya adalah asam laktat, peroksida, dan bakteriosin. Flora normal pada usus memiliki fungsi perlindungan yang penting untuk menekan bakteri patogen dan virus, menstimulir daya tahan lokal dan sistemik, serta mengubah aktivitas metabolik mikrob usus. Selain itu, mikrob probiotik juga menekan mikrob patogen karena terjadinya kompetisi sisi penempelan (reseptor), peningkatan produksi lender atau mukosa usus, dan kompetisi nutrisi (Salminen dan Wright, 1993).

## KESIMPULAN

Dalam saluran pencernaan ikan gurame terdapat mikroflora dan yang berhasil diisolasi ada 12 jenis mikrob, terdiri atas 4 jenis mikroba proteolitik aerob (*Staphylococcus* sp., *Clostridium* sp., *Bacillus* sp. dan *Moraxella* sp.), 2 jenis mikroba proteolitik anaerob (*Nitrococcus* sp. dan *Aeromonas* sp.), 3 jenis mikroba amilolitik aerob (*Mycobacterium* sp. *Laktobacillus* sp. dan *Aeromonas* sp.) dan 3 jenis mikroba amilolitik anaerob (*Carnobacterium* sp., *Citrobacter* sp. dan *Streptococcus* sp.). Mikroflora tersebut, berdasarkan kajian literatur sebagian merupakan mikrob yang menguntungkan dalam fungsi fisiologis saluran pencernaan dan sebagian merupakan mikrob patogen. Interaksi yang terjadi antara mikrob yang menguntungkan dan yang patogen sangat penting di dalam mempertahankan keseimbangan mikroflora saluran pencernaan.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi yang telah membiayai penelitian ini melalui Proyek Hibah Bersaing VIII Tahun Anggaran 2005 sampai 2007.

## DAFTAR PUSTAKA

- Al-Harbi, A.H. & N. Uddin. 2005. **Bacterial diversity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in brackish water in Saudi Arabia.** Aquaculture 250:566-572
- Cipriano, R.C., A.F. Larisa, D.T. Jeffrey & E.H. Laura. 1992. **Detection of *Aeromonas salmonicida* in the mucus of salmonid fishes.** Journal of Aquatic Animal Health 4 : 114-118.
- Clarke, R.T.J. & T. Bauchop. 1977. **Microbial Ecology of Gut.** Academic Press, London, New York, San Francisco.
- Das, K.M. & S.D. Tripathi. 1991. **Studies on the digestive enzymes of grass carp, *Ctenopharyngodon idella*, (Val.).** Aquaculture 92 : 11 - 21.
- De Schrijver, R. & F. Ollevier. 2000. **Protein digestion in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) and effects of dietary administration of *Vibrio proteolyticus*.** Aquaculture 186:107-116.
- Fuller, R. 1989. **Probiotics in man and animal.** Microbiology 66:365-378.
- Garcia, T., K. Otto, S. Kjellieberg & R. Nelson. 1997. **Growth of *Vibrio anguillarum* in salmon intestinal mucus.** Appl. Environ. Microbiol 63:1034-1039.
- Haryanti, K. Sugama, S. Lante & S. Tsumura. 1999. **Isolasi, identifikasi dan aplikasi probiotik *Flavimonas* BY-9 pada pemeliharaan larva udang windu (*Penaeus monodon*).** Jurnal Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian Departemen Pertanian 2:41-50.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley & S.T. Williams. 1994. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.** 6th Edition. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Hoshino, T., K. Ishizaki, T. Sakamoto, H. Kumeta, I. Yumoto, H. Matsuyama & S. Ohgiya. 1997. **Isolated an *pseudomonas* sp. of fish intestine excretion a active protease at low temperature.** Lett Appl Microbiol 25 : 70 - 72.
- Hungate, R. 1966. **The Rumen and its Microbes.** Academic Press, London and New York.
- Jankauskiene, R. 2002. **Bacterial flora of fishes from aquaculture: The genus *Lactobacillus*.** Institute of Ecology Akademijos 2, Vilnius 2600. Lithuania, e-mail:ekoi@ekoi.lt. <http://www.hbu.Cas.C2-ResLim 2002-PRINT-151-154.pdf>.
- Jusadi, D., A. Muis & I. Mokoginta. 2000. **Kebutuhan vitamin C benih ikan gurame *Osphronemus gouramy*.** Journal Ilmu-ilmu Perairan dan Perikanan Indonesia 7 (1): 17 - 26.
- Mokoginta, I., A. Suprayudi & M. Setiawati. 1996. **Kebutuhan optimum protein dan energi pakan benih ikan gurame (*Osphronemus gouramy* Lac.).** Journal Penelitian Perikanan Indonesia I(3): 82 - 94.
- Mokoginta, I., T. Takeuchi, M.A. Suprayudi, Y. Wiramiharja & M. Setiawati. 1999. **Pengaruh sumber karbohidrat yang berbeda terhadap pencernaan pakan, efisiensi pakan dan pertumbuhan benih ikan gurame (*Osphronemus gouramy* Lac.).** Journal Ilmu-ilmu Perairan dan Perikanan Indonesia VI(2): 13 - 19.
- Mubin, S.B. 1994. **Pengaruh tingkat pemberian pakan terhadap pertumbuhan ikan gurame (*Osphronemus gouramy* Lac.) berukuran 2.5 g pada suhu media 29°C.** Skripsi.

Fakultas Perikanan, Institut Pertanian Bogor, Bogor.

- Nakayama, A., Y. Yano & K. Yoshida. 1994. **New method for isolating Barophiles from intestinal contents of deep-sea fishes retrieved from the abyssal zone.** *Applied and Environmental Microbiology* 60(11): 4210-4212.
- Olsen, A.I., Y. Olsen, Y. Attramadal, K. Chrestie, T.H. Birkbeck, J. Skjermo & O. Vadstein. 2000. **Effect of term feeding of microalgae on the bacterial flora associated with juvenile *Artemia franciscana*.** *Aquaculture* 190:11-25.
- Opuszynski, K. & J.V. Shireman. 1994. **Herbivorous Fishes, Culture and Use for Weed Management.**: Cooperation with USFWS National Fisheries Research Center Gainesville, CRC Press Boca Raton Ann Arbor, Florida, London, Tokyo.
- Pelczar, M.J.Jr. & E.C.S. Chan. 1986. **Dasar-Dasar Mikrobiologi.** (diterjemahkan dari bahasa Inggris oleh Hadioetomo, R.S., T. Imas, S.S. Tjitrosomo & S.L. Angka). Volume ke-1,2. UI Press, Jakarta.
- Rengpipat, S., W. Phianphak, S. Piyatiratitivorakul & P Menasveta. 1998. **Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth.** *Aquaculture* 167:301-313.
- Rengpipat, S., S. Rukpratanporn, S. Piyatiratitivorakul & P. Menasaveta. 2000. **Immunity enhancement in black tiger shirimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus S11*).** *Aquaculture* 191: 271-288.
- Robertson, P.A.W., C.O. Dowd, C. Burrells, P. Williams & Austin B. 2000. **Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum).** *Aquaculture* 185:235-243.
- Rombaut, G., Ph. Dhert, J. Vandenberghe, L. Verschuere, P. Sorgeloos & W. Verstraete. 1999. **Selection of bacteria enhancing the growth rate of axenically hatched rotifers (*Brachionus plicatilis*).** *Aquaculture* 176:195-207.
- Sakata, T. & T. Yuki. 1992. **Diagnostic media for differentiation of *Plesiomonas* from intestinal microflora of freshwater fish.** *Nippon Suisan Gakkaishi* 58 (5) 977.
- Salminen, S. & A. von-Wrigh. 1993. **Lactic Acid Bacteria.** Mascel Dekker, New York.
- Spanggaard, S., I. Huber, J. Nielsen, T. Nielsen, K.F. Appel & L. Gram. 2000. **The mikroflora of rainbow trout intestinal: a comparison of traditional and molecuar identification.** *Aquaculture* 182:1-15.
- Sugita, H., T. Nakamura, K. Tanaka & Y. Deguchi. 1994. **Identification of *Aeromonas* species isolated from freshwater fish with microplate hybridization method.** *Applied and Environmental Microbiology*. 60(8):3036-3038.
- Suprayudi, M.A., T. Takeuchi, I. Mokoginta & T. Kartikasari. 2000. **The effect of additional arginine in the high defatted soybean meal diet on the growth of giant gouramy *Osphronemus gouramy* Lac.** *Fish Sci* 13 :178 - 187.
- Surono, I.S.. 2004. **Probiotik Susu Fermentasi dan Kesehatan.** PT. Tri Cipta Karya, Jakarta.
- Tae Kwang Oh. 2003. **Probiotik effect of *Weissella hellenica* DS-12 in flounder (*Paralichthys olivaceus*).** Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, PO Box 115, Yusung, Taejon, 305–600, Korea. Htm Microsoft HTML Document 5,0.
- Xue, X.M., A.J. Anderson, N.A. Richardson, A.J. Anderson, G.P. Xue & P.B. Mather. 1999. **Characterisation of cellulase activity in the digestive system of the redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*).** *Aquaculture* 180:373-386.