

Upaya Isolasi Bakteri *Indigenous Ikan Nila (Oreochromis sp)* Sebagai Kandidat Probiotik yang Diperkaya Pada Limbah Cair Tahu terhadap Laju Pertumbuhan Spesifik

TESIS



Oleh :
Agung Setia Abadi
146080100011004

PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN

MINAT NUTRISI DAN PAKAN IKAN

PROGRAM STUDI MAGISTER BUDIDAYA PERAIRAN
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2016

Upaya Isolasi Bakteri *Indigenous Ikan Nila (Oreochromis sp)* Sebagai Kandidat Probiotik yang Diperkaya Pada Limbah Cair Tahu terhadap Laju Pertumbuhan Spesifik

TESIS

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Magister**

Oleh:

**Agung Setia Abadi
NIM: 146080100011004**

**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
MINAT NUTRISI DAN PAKAN IKAN**

**PROGRAM PASCASARJANA
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN**
**UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2016

JUDUL TESIS :

**UPAYA ISOLASI BAKTERI *INDIGENOUS IKAN NILA (OREOCHROMIS SP)*
SEBAGAI KANDIDAT PROBIOTIK YANG DIPERKAYA PADA LIMBAH CAIR**

TAHU TERHADAP LAJU PERTUMBUHAN SPESIFIK

Nama Mahasiswa : AGUNG SETIA ABADI

NIM : 146080100011004

Program Studi : Budidaya Perairan

Minat : Nutrisi dan Pakan Ikan

Komisi Pembimbing

Ketua : Dr. Ir. Anik Martinah Hariati, M.Sc

Anggota : Dr. Ating Yuniarti, S.Pi M.Aqua

Komisi Penguji

Dosen Penguji 1 : Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS

Dosen Penguji 2 : Dr. Ir. Anies Chamidah, MP

Tanggal Ujian Tesis : 13 Januari 2017

PERNYATAAN

ORIGINALITAS TESIS

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam Naskah Tesis ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah Tesis ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur PLAGIASI, saya bersedia Tesis (MAGISTER) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku (UU No. 20 Tahun 2003, pasal 25 ayat 2 dan pasal 70).

Malang, 07 Januari 2017
Penulis

Agung Setia Abadi
146080100011004



Berikanlah rahmat kepada kami dari sisi-Mu dan sempurnakanlah petunjuk yang lurus bagi kami dalam urusan kami (QS. 18;10).

Ya Rabb ku, Ampunilah aku dan Kedua orangtuaku dan Orang-orang mukmin pada hari terjadinya hisab (hari kiamat) (QS. Ibrohim, 41).

Ya Allah, Milik-Mu-lah Pujian Seluruhnya (HR. Ahmad)

Karya ilmiah ini dipersembahkan kepada

1. Almarhumah Ibunda TerCINTAKU Hj. Zainamah Binti Maduri

2. Bapak TerCINTAKU H. Sugeng Mujiono Bin Mat Aji



Repository Universitas Brawijaya
Penulis dilahirkan di Jombang, Jawa Timur pada tanggal 01 Oktober 1992, Putra keempat dari keluarga Bapak H. Sugeng Mujiono Bin Mat Aji dan Almarhumah Ibu Hj Zainah Binti Maduri. Penulis menamatkan pendidikan Sekolah Dasar, Sekolah Menengah Pertama, Sekolah Menengah Atas diselesaikan di Jombang dan Strata S 1 Pascasarjana di Universitas Brawijaya Malang, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, dengan bantuan dan Do'a Orang tua.

Pada tahun 2015 penulis berkesempatan untuk melanjutkan pendidikan Program Pascasarjana di Universitas Brawijaya Malang, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, dengan bantuan dan Do'a Orang tua.

Malang, 07 Januari 2017

Penulis



RINGKASAN

AGUNG SETIA ABADI. 146080100011004. Upaya Isolasi Bakteri *Indigenous* Ikan Nila (*Oreochromis* sp) Sebagai Kandidat Probiotik yang Diperkaya Pada Limbah Cair Tahu terhadap Laju Pertumbuhan Spesifik Dr. Ir. Anik Martinah Hariati, M.Sc dan Dr. Ating Yuniarti. S.Pi. M.Aqua

Budidaya ikan nila secara intensif dalam usaha pemenuhan dan peningkatan produksi berakibat pada penggunaan pakan komersil yang semakin meningkat. Pakan merupakan faktor penentu kelangsungan hidup dan laju pertumbuhan ikan. Pakan menyedot 60-70% biaya produksi. Ikan nila (*Oreochromis* sp.) membutuhkan protein pakan yang mencapai 28-40%. Protein merupakan aspek penting yang dibutuhkan pada pemeliharaan ikan, namun ikan nila hanya memiliki rasio efisiensi protein sekitar 20-25%. Usaha peningkatan efisiensi pakan dan retensi protein dapat dilakukan dengan penggunaan probiotik. Probiotik akan membantu meningkatkan penyerapan nutrisi dan akan meningkatkan laju pertumbuhan. Berbagai macam probiotik beredar di pasar dengan harga yang tidak murah. Untuk menurunkan biaya produksi dibutuhkan inovasi dengan cara membuat media hidup bakteri probiotik dari bahan buangan semisal limbah cair tahu. Hasil analisa limbah cair tahu memiliki kandungan C_{org} 0,16% dan N_{total} 0,02% (8:1). Tujuan penelitian ini yaitu memanfaatkan limbah cair tahu sebagai media bakteri probiotik. Metode Penelitian metode deskriptif eksploratif. Metode deskriptif eksploratif digunakan untuk memperoleh kandidat probiotik yang dilakukan dengan metode skrining yang meliputi uji morfologi, uji patogenitas, uji antagonisme, uji enzim ekstra selluler, uji pertumbuhan, dan identifikasi secara konvensional. Sedangkan metode eksperimen digunakan untuk menguji pengaruh kandidat probiotik terhadap ikan sehingga diketahui pengaruhnya terhadap Kelulushidupan, Laju Pertumbuhan Spesifik, Kenversi Pakan, Efisiensi Pakan, Efisiensi protein dan Retensi protein.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa karakter bakteri *Indigenous* yang berpotensi sebagai probiotik yaitu bersifat gram +, apatogen (haemolisin γ), Antagonis terhadap bakteri *Aeromonas hidrophyla* (15,75 mm) dan *E. tarda* (16,98 mm), menghasilkan enzim proteolitik (12,48±0,67 mm), amilolitik (5,37±0,026 mm), dan lipolitik (5,75±0,146 mm), mempunyai konstanta laju pertumbuhan yang lebih baik daripada bakteri patogen *Aeromonas hidrophyla* (0,942 generasi/jam), stabil dan mampu hidup dalam pakan. Hasil uji biokimiawi menunjukkan bahwa isolat dengan karakter tersebut adalah bakteri *Bacillus* sp. Pengkayaan limbah cair tahu dengan C:N rasio 10 menghasilkan konstanta laju pertumbuhan sebesar 0,736 generasi/jam, sedangkan kontrol 0,737 generasi/jam. Dosis bakteri indigenous 10⁷ cfu/gr secara nyata meningkatkan laju perumbuhan spesifik 0,90 %BB/hari dibandingkan kontrol. Menurunkan konversi pakan 1,13, meningkatkan efisiensi pakan 19,25%, rasio efisiensi protein meningkat 0,62, retensi protein meningkat 6,75% dan kelimpahan mikroba pada usus meningkat 31,869x10¹¹ cfu/ml.

Kualitas parameter kualitas air selama penelitian masih dalam keadaan normal atau sesuai dengan kebutuhan ikan yaitu dengan nilai rata-rata pada pH 7,24-7,49, suhu 28,67-28,33 °C, dan pada kadar oksigen terlarut DO sebesar 3,20 dan 3,10 ppm.



KATA PENGANTAR

Segala puji syukur ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa atas segala rahmat, cinta kasih dan karunia-Nya serta menyertaan-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan Tesis yang berjudul “Upaya Isolasi Bakteri Indigen Ikan Nila (Oreochromis sp.) Sebagai Kandidat Probiotik Yang Diperkaya Pada Limbah Cair Tahu Terhadap Laju Pertumbuhan Spesifik”. Proposal tesis ini merupakan salah satu syarat yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Budidaya Perairan (S-2) pada Program Pasca Sarjana Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang.

Penulis mengucapkan banyak-banyak terimakasih kepada Ibu Dr. Ir. Anik Martinah Hariati, M.Sc selaku dosen pembimbing I yang telah memberikan bimbingan dalam pembuatan proposal tesis ini. Ibu Dr. Ating Yuniarti, S.Pi. M.Aqua selaku dosen pembimbing II yang telah memberikan bimbingan dalam pembuatan proposal tesis ini.

Penulis menyadari bahwa penulisan proposal tesis ini masih belum sempurna. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran demi kesempurnaan proposal tesis ini.

Malang, 1 November 2017

Penulis

UCAPAN TERIMAKASIH

Pada kesempatan ini, penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar - besarnya kepada:

Allah Subhanahu wata'alla. Dan Sholawat serta salam semoga tetap tercurahkan kepada Nabi yulloh Rosull akhir zaman Muhammad SAW. Karena dengan ridho Allah dan Ajaran Rosull penulis dapat menyelesaikan tulisan ini.

1. Kedua orang tua Ibu Hj. Zainamah (Almrh) dan Bapak H. Sugeng Mujiono yang selalu memberikan dukungan serta doa untuk kelancaran penyelesaian proposal tesis ini.
2. H. Lukmah Hakim, Lukman Fauzi, dan Moh Fatichin S.kom selaku kakak-kakak tersayang yang senantiasa ikut mendoakan dan menyemangati.
3. Laboran Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan (Ibu Titin) yang banyak membantu demi terselesainya penelitian ini.
4. Widya Putra G, Dwiyana S, Panjang U, dan M E S Dany serta teman-teman yang lain sebagai teman seperjuangan yang selalu mengingatkan untuk cepat menyelesaikan proposal tesis ini.
5. Anggota Lab Fit yang selalu ceria mendukung.
6. Teman – teman BP Hooligan yang selalu memberikan semangat.
7. Teman – teman Magister seluruhnya tanpa terkecuali

Malang, 9 Juni 2016

Penulis

COVER	Halaman
LEMBAR PERSYARATAN	iii
LEMBAR PENGESAHAN	iv
LEMBAR JUDUL	v
LEMBAR PERSEMBERAHAN	vi
DAFTAR RIWAYAT HIDUP	vii
RINGKASAN	viii
KATA PENGANTAR	ix
UCAPAN TERIMA KASIH	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian	3
1.4. Manfaat Penelitian	4
2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Biologi Ikan Nila	5
2.2 Pertumbuhan	5
2.3 Kelulushidupan	6
2.4 Laju Pertumbuhan Spesifik	6
2.5 Konversi Pakan	7
2.6 Efisiensi Pakan	8
2.7 Rasio Efisiensi Protein dan Retensi Protein	8
2.8 Probiotik dan Pemilihannya	9
2.9 Isolasi dan Skrining Kandidat Probiotik	10
2.9.1 Isolasi Bakteri	10
2.9.2 Daya Patogenitas dan Antagonisme	11
2.9.3 Pertumbuhan Bakteri	11
2.9.3 Uji Enzim Ekstraselluler	12
2.10 Mekanisme Bakteri Probiotik	14

Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
2.11 Media Tumbuh Bakteri Probiotik	15
2.12 Limbah Cair Tahu (LCT).....	16
2.13 Aplikasi Probiotik Pada Akuakultur	17
2.14 Kualitas Air Pemeliharaan	18
2.14.1 Suhu.....	18
2.14.2 Dissolved Oxygen (DO)	19
2.14.3 pH.....	20
3. KERANGKA PENELITIAN	21
3.1 Landasan Teori Penelitian.....	21
3.2 Kerangka Konsep Penelitian dan Hipotesis.....	24
3.3 Kerangka Operasional Penelitian	26
3.4 Kebaruan Penelitian	31
3.5 Strategi Publikasi	31
4. MATERI DAN METODE PENELITIAN	32
4.1 Materi Penelitian	32
4.1.1 Alat Penelitian	33
4.1.2 Bahan Penelitian	35
4.2 Metode Pengambilan Data Penelitian	36
4.3 Sampel dan Rancangan Penelitian	36
4.3.1 Sampel Penelitian	36
4.3.2 Rancangan Penelitian	37
4.4 Waktu, Lokasi dan Rencana Tahapan Penelitian	37
4.5 Prosedur Penelitian	38
4.5.1 Penelitian Pendahuluan	38
4.5.2 Penelitian Inti	38
4.6 Kegiatan Penelitian	38
4.6.1 Persiapan dan Skrening Bakteri Kandidat Probiotik	38
4.6.2 Identifikasi Bakteri kandidat Probiotik	44
4.6.3 Pengkayaan Bakteri Kandidat Probiotik	45
4.6.4 Uji Viabilitas Bakteri Kandidat Probiotik Pada Pakan	46
4.6.5 Pemberian Dosis Pada Pakan	46
4.6.6 Pengukuran Parameter Uji	46
4.7 Analisa Data	51
5. HASIL DAN PEMBAHASAN	52
5.1 Karakterisasi Kandidat Probiotik	52
5.1.1 Uji Morfologi	52
5.1.2 Uji Daya Patogenias dan Antagonisme	54
5.1.3 Uji Pertumbuhan Bakteri	56
5.1.4 Uji Enzim Ekstraselluler	58
5.1.5 Identifikasi atau uji biokimia	61
5.2 Pengkayaan pada Limbah Cair Tahu	64
5.3 Uji Viabilitas Bakteri	66
5.4 Aplikasi Kandidat Probiotik (Uji <i>in-vivo</i>)	67
5.4.1 Kelulushidupan	68
5.4.2 Laju Pertumbuhan Spesifik	69
5.4.3 Konversi Pakan	70

5.4.4 Efisiensi Pakan	71
5.4.5 Rasio Efisiensi Protein dan Retensi Protein	72
5.4.6 Retensi Protein	73
5.5 Kelimpahan Bakteri Usus (KBU)	74
5.6 Parameter Penunjang	75
5.6.1 pH	76
5.6.2 Suhu °C	76
5.6.3 DO	76
6. Kesimpulan dan Saran	76
DAFTAR PUSTAKA	78
LAMPIRAN	90

Gambar

DAFTAR GAMBAR

Halaman

1. Ikan Nila (<i>Oreochromis</i> sp.)	5
2. Kerangka Konsep Penelitian	25
3. Kerangka Operasional Penelitian Tahap 1	30
4. Kerangka Operasional Penelitian Tahap 2	31
5. Denah Penelitian.....	38
6. Morfologi pewarnaan bakteri	53
7. Karakterisasi ekstraselluler enzim isolat NL 004	59
8. Karakter pertumbuhan kultur limbah cair tahu	64
9. Viabilitas bakteri kandidat dalam pakan	66

Tabel

DAFTAR TABEL

Halaman

1. Penelitian Terdahulu	21
2. Strategi Publikasi	32
3. Peralatan Penelitian dan Fungsi	33
4. Bahan Penelitian dan Fungsi	34
5. Metode dan Variabel Penelitian	37
6. Hasil Morfologi Isolat Bakteri Kandidat Probiotik	52
7. Hasil Uji Patogenitas dan Antagonisme	53
8. Hasil Karakterisasi Pertumbuhan Bakteri Selama 29 Jam	57
9. Hasil Uji Ekstraselluler Enzim Bakteri Kandidat Probiotik	58
10. Hasil Identifikasi Morfologi, Biokimia Dan Fermentasi Karbohidrat	60
11. Karakterisasi pertumbuhan bakteri kandidat isolat NL_004 pada LCT	62
12. Hasil uji parameter utama penelitian dengan <i>t independent test</i>	65
13. Uji t parameter penunjang kualitas air selama penelitian	74

Lampiran

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

1. Hasil analisa Limbah Cair Tahu (LCT)	90
2. Hasil Uji analisis proksimat pakan dan ikan nila	92
3. Prosedur Tahapan isolasi bakteri	93
4. Prosedur pembuatan media MRSA dan TSB	94
5. Prosedur analisis gram dan uji patogenitas	95
6. Prosedur Uji antagonisme dan uji karakterisasi pertumbuhan	96
7. Prosedur Uji enzim ekstraseluler amilase dan protease	97
8. Prosedur Uji enzim ekstraseluler lipase	98
9. Identifikasi bakteri	99
10. Perhitungan C:N Rasio Kultur Limbah Cair tahu	100
11. Perhitungan dosis pada pakan	101
12. Data Jumlah Koloni, Tepi Koloni, Warna Koloni, dan Bentuk Koloni	102
13. Hasil Uji patogenitas dan identifikasi gram	103
14. Hasil Uji Antagonisme	104
15. Hasil Uji Ekstrasellular Enzim	105
16. Hasil uji karakteristik pertumbuhan bateri selama 29 jam	106
17. Hasil Uji Biokimia	111
18. Analisa data parameter utama dan parameter penunjang	104
19. Normalitas data pengaruh pemberian probiotik terhadap laju pertumbuhan spesifik	114
20. Analisa perhitungan data parameter utama SR selama 30 hari pemeliharaan	115
21. Analisa perhitungan data parameter utama SGR selama 30 hari Pemeliharaan	117
22. Analisa perhitungan data parameter utama FCR selama 30 hari Pemeliharaan	119
23. Analisa perhitungan data parameter utama FE selama 30 hari Pemeliharaan	121
24. Analisa perhitungan data parameter utama PER selama 30 hari Pemeliharaan	124
25. Analisa perhitungan data parameter utama RP selama 30 hari Pemeliharaan	125
26. Analisa perhitungan data parameter utama KBU selama 30 hari Pemeliharaan	127
27. Analisa perhitungan data parameter Kualitas air pH, Suhu, DO selama 30 hari Pemeliharaan	129
28. Dokumentasi penelitian	132

1.1 Latar Belakang

Ikan nila (*Oreochromis* sp.) termasuk dalam ikan konsumsi air tawar yang menduduki peringkat tiga produksi akuakultur dunia (Telli *et al.*, 2014). Kandungan protein pada ikan nila sebesar 9,72% berat basah. Potensi budidaya ikan nila sangat besar dengan permintaan yang terus mengalami peningkatan yaitu pada tahun 2015 berjumlah 1.656.600 ton dan pada tahun 2016 ditargetkan produksi sebesar 1.822.200 ton atau mengalami peningkatan 10,85 % pertahun (Anonymous, 2016).

Budidaya ikan nila secara intensif dalam usaha pemenuhan dan peningkatan produksi berakibat pada penggunaan pakan komersil yang semakin meningkat.

Pakan merupakan faktor penentu kelangsungan hidup dan laju pertumbuhan ikan. Pakan menyedot 60-70% biaya produksi (Ardita *et al.*, 2015). Ikan nila (*Oreochromis* sp.) membutuhkan protein pakan yang mencapai 28-40%. Protein merupakan aspek penting yang dibutuhkan pada pemeliharaan ikan, namun ikan nila hanya memiliki daya cerna protein 75% dan efisiensi pakan sekitar 34-36% (Soedibya, 2013; Abdel-

Tawwab *et al.*, 2010).

Beberapa penelitian dilakukan untuk meningkatkan efisiensi pakan.

Penelitian tersebut diantaranya penggunaan probiotik *indigenous* jenis bakteri *Bacillus* sp., *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus collonooides*, *Lactobacillus farciminis*, *Vibrio* sp. dan *Pseudomonas fluorescens* yang banyak ditemukan di dalam saluran pencernaan ikan nila (Hai, 2015). Peningkatan penggunaan tepung ikan dengan tambahan taurin, mengkombinasi penggunaan enzim eksogenus dengan probiotik, menggunakan protein pakan sebesar 45% secara nyata dapat meningkatkan pertumbuhan spesifik sebesar 4.287 %BB/Hari, pada ikan nila ukuran 4-5 gr (Abdel-

PENDAHULUAN

Tawwab *et al.*, 2010; Adeoye *et al.*, 2016; Koch *et al.*, 2016). Salah satu peningkatan efisiensi pakan dapat dilakukan dengan meningkatkan rasio efisiensi protein ikan melalui penggunaan probiotik..

Probiotik akan membantu meningkatkan penyerapan nutrisi dan akan meningkatkan laju pertumbuhan (Maftei *et al.*, 2012). Probiotik dalam sistem metabolismenya harus mampu mendegradasi pakan dengan menghasilkan enzim amilase, protease dan lipase. Enzim amilase berfungsi memecah molekul amilum. Lipase merupakan enzim yang dapat menjadi biokatalis pada reaksi hidrolisis triacylglycerol menjadi gliserol dan asam lemak. Enzim protease yaitu sekelompok enzim yang berfungsi untuk menghidrolisis protein, kemampuan menghasilkan enzim banyak dimiliki oleh bakteri *indigenous* yang tinggal didalam saluran pencernaan, bakteri *indigenous* adalah bakteri yang dominan hidup dan tinggal pada inang (Handajani *et al.*, 2013; Lara-flores 2011; Richana, 2000; Aslamyah, 2008; Rao *et al.*, 1998). Selain menghasilkan enzim ekstraselular bakteri probiotik juga memiliki berbagai syarat.

Syarat bakteri dapat dijadikan probiotik yaitu dapat bertahan terhadap pH rendah, mampu bertahan hidup melalui traktus, melekat pada sel-sel usus, stabil terhadap mikroflora usus, mampu bertahan hidup dalam bahan makanan, mampu berkoloni dan berkembang biak dengan cepat, dapat digunakan sebagai tambahan dalam pakan, menguntungkan dalam pertumbuhan, antagonis terhadap bakteri patogen, serta dapat disimpan dalam suhu normal (Merrifield *et al.*, 2010; Dito, 2014). Secara alami bakteri probiotik dapat diisolasi dari usus ikan (*indigenous*) sebagai indikasi bahwa bakteri tersebut mampu menempel pada dinding sel usus ikan.

Berbagai macam probiotik beredar di pasar dengan harga yang tidak murah.

Untuk menurunkan biaya produksi dibutuhkan inovasi dengan cara membuat media

hidup bakteri probiotik dari bahan buangan semisal limbah cair tahu (LCT).

Beberapa limbah dapat digunakan menjadi media probiotik diantaranya air jerami,

molase, dan limbah cair keju (Jing-jing *et al.*, 2015; Delev *et al.*, 2006).

Hasil analisa limbah cair tahu memiliki kandungan nutrisi total C_{org} 0,16% dan

N_{total} 0,02% (8:1) (Lampiran 1). Jumlah produksi industri tahu skala rumah tangga di

Kabupaten Jombang dalam satu hari rata-rata membutuhkan 100 kg kedelai dengan

begitu paling sedikit menghasilkan 3.000 liter limbah cair tahu. Inovasi

memanfaatkan nutrisi limbah cair tahu sebagai media bakteri probiotik akan sangat

dibutuhkan baik sebagai pengganti media umum TSB (*Tryptic Soy Broth*), maupun

sebagai agen bioremediasi (Vine, 2004). Inovasi memanfaatkan nutrisi limbah cair

tahu pada penelitian ini diharapkan akan menjadi solusi untuk meningkatkan

produksi ikan nila dengan biaya operasional lebih murah sehingga keuntungan yang

didapat akan meningkat.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas dapat diambil rumusan masalah

diantaranya:

a. Bagaimana karakteristik bakteri *indigenous* ikan nila (*Oreocromis* sp.)

yang terdapat pada saluran usus ikan nila yang berpotensi sebagai

kandidat probiotik?

b. Bagaimana karakteristik

pertumbuhan bakteri *indigenous* ikan nila

media pengkaya limbah cair tahu dengan

c. Bagaimana karakteristik laju pertumbuhan spesifik ikan nila (*Oreochromis* sp.) dengan suplementasi bakteri *indigenous*?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini yaitu sebagai berikut:

a. Mendapatkan karakter bakteri *indigenous* ikan nila (*Oreocromis* sp.) yang

berpotensi sebagai kandidat probiotik.

b. Mendapatkan karakter pertumbuhan bakteri *indigenous* ikan nila

(*Oreocromis* sp) pada media limbah cair tahu dengan penambahan C:N

rasio. Limbah cair tahu untuk dijadikan media pengkaya bakteri

indigenous ikan nila (*Oreochromis* sp).

c. Mendapatkan karakter laju pertumbuhan spesifik ikan nila (*Oreochromis*

sp.) dengan suplementasi bakteri *indigenous* kandidat probiotik.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini yaitu untuk memberikan solusi dalam pengolahan

limbah cair tahu untuk dijadikan media pengkaya bakteri *indigenous* pengganti TSB,

selain itu mendapat probiotik baru yang lebih ekonomis sehingga produksi ikan nila

dapat meningkat dan lebih menguntungkan.

2.1 Biologi Ikan Nila (*Oreochromis* sp.)

Ikan nila merupakan jenis ikan air tawar yang berasal dari Afrika bagian timur. Pengembangan budidaya ikan nila di perairan tawar di Indonesia dimulai tahun 1969. Ikan nila relatif mudah untuk tumbuh dalam kondisi sistem budidaya (Apun et al., 2009). Ikan nila mempunyai daya hidup yang tinggi dalam kondisi budidaya yang bervariasi, serta memiliki pertumbuhan yang cepat (Etyemez dan Balcazar, 2016).

Menurut Saanin (1984), ikan nila (*Oreochromis* sp.) mempunyai klasifikasi meliputi: Filum: Chordata, Subfilum: Vertebrata, Kelas: Osteichthyes, Subkelas: Acanthopterygii, Ordo: Percomorphi, Subordo: Percoidea, Famili: Cichlidae, Genus: *Oreochromis*, Spesies: *Oreochromis* sp. secara morfologi dapat dilihat pada Gambar 1. di bawah ini.



Gambar 1. Ikan nila (*Oreochromis* sp.) (Anonymous, 2016)

2.2 Kelulushidupan/Survival Rate (SR)

Kemampuan hidup ikan dipengaruhi oleh sifat, jumlah dan kualitas pakan yang diberikan, serta kualitas air. Pemberian probiotik *Bacillus S11* selama 3 minggu

2. TINJAUAN PUSTAKA

meningkatkan kelulushidupan 26% (Rengipat *et al.*, 1998). Kematian ikan pada pasca larva yang meningkat disebabkan ketidak sesuaian pakan dan adanya bakteri

patogen. Probiotik sebagai suplemen dapat meningkatkan produktifitas dan secara aktif menghambat patogen (Apun *et al.*, 2009).

Kemampuan ikan dalam melawan bakteri patogen akan meningkatkan kelulushidupan dengan cara meningkatkan aktifitas phagositosis, memproduksi antibodi, meningkatkan respon *chemiluminiscent* dan memproduksi anion superokksida (Fyzul *et al.*, 2014). Peningkatan kualitas lingkungan pemeliharaan akan menjadi promotor meningkatnya kelulushidupan (Arig *et al.*, 2013).

2.3 Pertumbuhan/Growth

Pertumbuhan merupakan performa yang ditunjukkan oleh hewan uji selama penelitian. Pertumbuhan erat kaitanya dengan pertambahan berat (*Weight gain*), laju pertumbuhan spesifik (*Specific Growth Rate*), dan konversi pakan (*feed conversion ratio*) (Geraylou *et al.*, 2013). Kebutuhan nutrien pakan digunakan untuk membangun dan melanjutkan kehidupan. Sumber utama nutrien pada ikan adalah protein (Ausmus, 2010).

Pertumbuhan adalah suatu ukuran pertambahan biomassa tubuh organisme yang diukur persatuan waktu (NavinChandran *et al.*, 2014). Kalkulasi faktor yang dilakukan untuk mengukur pertambahan berat dalam periode pemeliharaan, faktor-faktor tersebut adalah efisiensi pakan, rasio efisiensi protein dan faktor kondisi. Ketika faktor-faktor tersebut dapat dikendalikan maka pertumbuhan akan semakin baik (Heo *et al.*, 2013).

2.4 Laju Pertumbuhan Spesifik/*Spesific Growth Rate (SGR)*

Laju pertumbuhan erat kaitanya dengan efisiensi pakan dalam pemeliharaan.

Menurut Anggraini *et al.* (2012), laju pertumbuhan harian ikan nila dalam wadah pemeliharaan selama 40 hari sebesar 2,14 %BB/hari. Laju pertumbuhan ikan nila yang berusia 75 hari yang dipelihara selama 134 hari sebesar 3,16 %BB/hari (Apun *et al.*, 2009). Ikan nila merah memiliki laju pertumbuhan harian selama masa pemeliharaan 180 hari sebesar 1,278 % BB/hari (Haetami *et al.*, 2008).

Frekuensi pemberian pakan akan meningkatkan laju pertumbuhan spesifik ikan nila. Pemberian pakan selama 3, 4, dan 5 kali perhari mempunyai nilai SGR berturut-turut sebesar 9,08 %BB/hari, 9,79 %BB/hari dan 10,88 %BB/hari pada benih ukuran 0,018 gr (Ferdous *et al.*, 2014). Menurut Abd El-Rahman *et al.* (2009), laju pertumbuhan spesifik selama masa pemeliharaan dapat dihitung dengan rumus

$$\text{SGR} = 100 \frac{\ln W_t - \ln W_0}{t}$$

Dimana

SGR = Specific Growth Rate (%BB/hari)

W_0 = Berat awal ikan (gr)

W_t = Berat Akhir ikan (gr)

t = Lama pemeliharaan (hari)

2.5 Konversi pakan/*Feed Conversion Ratio (FCR)*

Konversi pakan berhubungan dengan waktu pemberian pakan, dan jumlah pakan yang diberikan. Konversi pakan digunakan untuk menghitung jumlah pakan yang harus diberikan. Nilai konversi pakan pada setiap ikan berbeda tergantung kondisi pemeliharaan (Sahzadi *et al.*, 2006). Waktu pemberian pakan mempengaruhi nilai konversi pakan, pemberian pakan sebanyak 5 kali perhari pada benih ikan nila menghasilkan konversi pakan sebesar 1,21 (Ferdous *et al.*, 2014).

Rasio konversi pakan dihitung dari berapa Kg pakan yang digunakan untuk menghasilkan satu Kg ikan (Saeed *et al.*, 2005). Rasio konversi pakan yang baik adalah tolok ukur baik atau tidaknya pakan untuk ikan. Nilai konversi pakan memberi informasi kondisi pemeliharaan ikan (Jabeen *et al.*, 2004). Konversi pakan tergantung dari pertumbuhan ikan yang dipelihara. Kestabilan dan kelimpahan mikroba dalam saluran usus akan meningkatkan konversi pakan (Ramos *et al.*, 2015).

2.6 Efisiensi pakan/Feed Efficiency (FE)

Efisiensi pakan merupakan kemampuan ikan dalam memanfaatkan pakan yang diberikan untuk meningkatkan berat tubuh dalam periode waktu tertentu (Ibrahim, 2013). Ukuran ikan akan mempengaruhi efisiensi pakan, ikan dengan ukuran dan umur yang masih muda lebih baik dalam memanfaatkan pakan untuk pertumbuhan (Abdel-tawwab *et al.*, 2010).

Efisiensi pakan dipengaruhi oleh kondisi pemeliharaan, jenis pakan, ukuran pakan dan waktu pemberian pakan. Kualitas pakan yang tinggi akan meningkatkan sistem imun dan efisiensi pakan (Adeoye *et al.*, 2016). Pertumbuhan ikan nila tergantung dari jumlah asam amino dalam pakan. Formulas penyesuaian kebutuhan akan meningkatkan efisiensi pakan dan laju pertumbuhan (Fernando *et al.*, 2016).

2.7 Rasio Efisiensi Protein/Protein Efficiency Ratio (PER) dan Retensi Protein

Menurut Des Silva dan Anderson (1995) *protein efficiency ratio* (PER) merupakan nilai perbandingan antara rata-rata pertambahan berat ikan selama pemeliharaan dengan jumlah konsumsi protein ikan. Nilai PER dihitung dengan rumus sebagai berikut:

Keterangan:

$$PER = \frac{Wt - W0}{\Sigma P \text{ Pkn}} \times 100\%$$

$W0$ = Berat rata-rata ikan nila pada awal pemeliharaan (gr)

Wt = Berat rata-rata ikan nila pada akhir pemeliharaan (gr)

$\Sigma P \text{ Pkn}$ = Jumlah pakan kering selama pemeliharaan (gr)

Menurut Buwono (2002) retensi protein merupakan persentase dari jumlah

protein yang dapat diserap dan dimanfaatkan oleh tubuh ikan untuk metabolisme,

membangun ataupun memperbaiki sel-sel tubuh yang rusak selama pemeliharaan.

Nilai retensi protein dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$RP = \frac{\Sigma Pt - \Sigma Po}{\Sigma PP} \times 100\%$$

Keterangan:

RP = Retensi Protein (%)

ΣPo = Jumlah Protein Tubuh Awal Ikan Nila (gram)

ΣPt = Jumlah Protein Tubuh Akhir Ikan Nila (gram)

ΣPP = Jumlah protein pakan (gram)

2.8 Probiotik dan Pemilihannya

Probiotik yaitu suatu yang hidup dari bakteri atau yeast yang menguntungkan

yang dapat menjaga dan mengendalikan kestabilan mikroba didalam saluran

pencernaan (Mc Farland, 2007). Probiotik adalah makanan berupa mikroorganisme

hidup yang menguntungkan dan memodulasi mikroba pencernaan sedangkan

prebiotik adalah suplemen pakan yang tidak bisa dicerna namun menguntungkan

bagi pencernaan (Akhter et al., 2015). Penggunaan probiotik memberikan pengaruh

pada inang dalam penyediaan nutrien dan berkontribusi dalam reaksi enzimatis (Gupta *et al.*, 2014).

Mikroflora dalam saluran pencernaan/usus yang telah diisolasi dan jika digunakan atau dikonsumsi akan dapat menstabilkan dan menyeimbangkan kerja mikroba yang ada dalam saluran pencernaan dan dapat menyehatkan (Hegar, 2007). Mikroorganisme hidup yang bertujuan sebagai promotor efek positif pada inang dengan cara meningkatkan kekayaan dari mikroorganisme *indigenous* yang menguntungkan (Shukla *et al.*, 2013). Isolasi bakteri menguntungkan atau probiotik dalam saluran cerna yang ketika digunakan akan memberikan pengaruh kesehatan pada inang dan dapat menjadi antibiotik dalam akuakultur (Han *et al.*, 2015).

2.9 Isolasi dan Skrining kandidat probiotik

2.9.1 Isolasi Bakteri

Bakteri probiotik banyak dijumpai pada saluran pencernaan, isolasi bakteri saluran cerna merupakan proses pencarian bakteri dengan memisahkan bakteri-bakteri lain yang tidak diinginkan sehingga terpilih satu koloni atau jenis bakteri yang menguntungkan yang dapat tumbuh dan menghasilkan enzim dalam suhu ruang (Aly *et al.*, 2012). Isolasi bakteri dapat dilakukan dengan menggunakan media buatan atau media alami (G. Mariandrea *et al.*, 2016).

Aplikasi dalam isolasi bakteri bertujuan seperti untuk memproduksi enzim, bioremediasi dan probiotik (Erdoğrul dan Erbilir 2006; Rupali, 2015; Krishnamoorthy *et al.*, 2016). Isolasi bakteri probiotik dalam saluran pencernaan secara langsung dapat dilakukan dengan memisahkan berbagai koloni untuk pemurnian. Karakteristik isolat bakteri murni dapat dilakukan dengan identifikasi untuk menentukan spesies secara biokimia dengan Cowan And Steel's Manual For The Identification Of

Medical Bacteria. Third edition (Arrizal dan Rachmadiarti 2008; NavinChandran et al., 2014).

2.9.2 Daya Patogenitas dan Antagonisme

Bakteri probiotik harus mampu berkompetisi dengan bakteri patogen sehingga mampu mereduksi patogenitas suatu bakteri (Qi et al., 2009). Aktivitas antagonisme dapat menjelaskan kemampuan bakteri dalam melawan bakteri patogen (Gupta et al., 2014).

Bakteri probiotik memiliki kemampuan untuk menghambat atau mengeliminasi beberapa bakteri patogen potensial. Kemampuan tersebut yaitu dengan cara memproduksi substansi hambat seperti antibiotik (substansi antibakteri), sidephoreres, enzim bakteriolitik, protease dan penghambat protease, asam laktat

dan komponen organik lain seperti bakteriosin, hydrogen perosida, asam butirat (Ibrahim, 2013).

2.9.2 Pertumbuhan Bakteri

Bakteri tumbuh dengan memanfaatkan nutrisi serta mengalami pertumbuhan hingga fase stasioner dalam spektrum yang luas dalam lingkungan fisik maupun kimia. Pertumbuhan dan aktivitas fisiologis lainnya terjadi karena respon fisiologis dari lingkungan sekitar. Laju pertumbuhan maksimal dipengaruhi oleh jumlah karbon dan nitrogen atau C:N rasio (Judoaminoto et al., 1992; Touratier et al., 1999; Vine, 2004).

Bakteri dalam pertumbuhannya akan mendegradasi dan mendekomposisi nutrien, dengan memproduksi material aktif seperti asam amino, enzim dan vitamin (Hassan et al., 2014). Laju pertumbuhan bakteri dipengaruhi oleh suhu. Penurunan



suhu 10°C secara cepat akan menurunkan produksi enzim 1-4 kali atau bahkan gagal memproduksi (Balcazar *et al.*, 2015).

2.9.3 Enzim Ekstrasellular

Aktifitas enzim proteolitik mendegradasi β -casein dalam suhu inkubasi 30°C dalam waktu 48 jam dengan adanya zona bening pada sekitar koloni (Terzic-Vidojevic *et al.*, 2015). Protease akan memotong rantai asam organik, seperti asam format dan asam propenat yang berfungsi mempermudah penyerapan makanan dan meningkatkan resistensi terhadap patogen (Reda *et al.*, 2016).

Bacillus sp. secara rahasia mengeluarkan enzim eksogenus dan komponen anti mikroba dengan mengurangi komponen nutrisi yang bersifat toxic dan memfasilitasi pencernaan inang dengan mencegah dan tidak mengizinkan kolonisasi bakteri patogen pada ruang dinding usus (NavinChandran *et al.*, 2014).

a. Enzim Amilase

Amilase adalah enzim yang memecah pati menjadi gula. Semua amilase merupakan penghidrolisa dari rantai glikosida dan beraksi umumnya pada rantai α 1,4-glikosidik. Amilase bekerja pada pati, oligosakarida dan polisakarida. (Karnwal dan Nigam 2013). α amilase adalah enzim yang mendegradasi polisakarida kompleks menjadi oligosakarida pendek. Amilase merupakan enzim yang memecah pati menjadi molekul-molekul gula atau disebut sebagai enzim penghidrolisis glikosida (Panheerselvam dan Elavarasi, 2015).

Produksi α amilase secara esensial dibutuhkan untuk mengkonversi atau merubah pati menjadi oligosakarida. Konversi pati oleh α amilase dalam skala industri menghasilkan maltodektrin, modifikasi pati, atau glukosa dan fruktosa dalam

bentuk sirup (de Souza dan Perola, 2010). Aktivasi enzim pada bakteri dipengaruhi oleh suhu (30-70 °C), pH (3,5-8,5), jenis substrat dan konsentrasi garam (Dutta *et al.*, 2006). Bakteri penghasil amilase diantaranya *Bacillus subtilis*, *Bacillus careus*, *Bacillus megaterium* (Zhang *et al.*, 2011; Verma *et al.*, 2011).

b. Enzim Protease

Protease merupakan kelompok enzim, yang bertugas sebagai katalisator dalam hidrolisis ikatan peptida dan merubahnya menjadi polipeptida atau asam amino bebas. Protease diklasifikasikan menjadi tiga kelompok besar yaitu Asam, netral, dan alkalin (Alnahdi, 2012). Protease memiliki anggota diantaranya proteinase, peptidase, atau enzim proteolitik yang memecah ikatan peptida diantara asam amino dari protein (Rupali, 2015).

Bakteri proteolitik secara alami tersebar di alam dan memungkinkan untuk tumbuh dalam kondisi yang bervariasi, seperti suhu yang berbeda, pH dan kondisi ion yang berubah-ubah (Prabakaran *et al.*, 2015). Protease dapat didefinisikan sebagai enzim yang merusak protein atau memotong-motong rantai protein menjadi sederhana. Beberapa mikro organisme menghasilkan enzim ekstraselluler protease seperti anggota jamur *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus* sp. sedangkan anggota bakteri diantaranya *Clostridium*, *Bacillus*, *Pseudomonas* sp. (Pokhrel *et al.*, 2014).

c. Enzim Lipase

Lipase salah satu produk mikroorganisme yang mempunyai variasi yang luas. Bakteri penghasil lipase bersifat glikoprotein, namun beberapa lipase dari ekstraselluler bakteri disebut lipoprotein. Lipase merupakan produk penghidrolisis trigliserida hingga membentuk digliserida, monogliserida, gliserol dan asam lemak. (Prasad, 2015). Lipase adalah enzim yang menghidrolisis ikatan ester dari substrat yang tidak larut air yang terletak pada permukaan antara substrat dengan air.

Produksi lipase dari mikroba dipengaruhi oleh substrat, pH dan Suhu. Bakteri memproduksi lipase sebagai bentuk pertahanan hidup untuk tumbuh yang mengantikan fungsi karbon sebagai energi (Selvamohan *et al.*, 2012).

Lipase adalah hidrolase serin dan mempunyai susunan G-X₁-S-X₂-G yang sebagian bersifat katalis, dimana G = glisin, S = serin, X₁ = histidin dan X₂ = glutamin

atau asam aspartat. Secara biologi fungsi lipase adalah katalisator dalam hidrolisis

triasilgliserol menjadi asam lemak bebas, diasilgliserol, monoasilgliserol dan gliserol

(Aravindan *et al.*, 2007). Lipase (triasilgliserol asilhidrolase, EC 3.1.1.3) merupakan

katalase dari hidrolisis dan sintesis ester dari glycerol dan rantai panjang asam

lemak. Beberapa lipase dihasilkan dari genera *Bacillus*, seperti *Bacillus*

thermoleoverans, *Bacillus stearotherophilus*, *Bacillus acidocaldarius* dan *Bacillus sp*

(Akshatha *et al.*, 2006).

2.10 Mekanisme Kerja Probiotik

Probiotik menempel pada dinding usus setelah 48 jam dari pemberian awal,

dengan cara meningkatkan regulasi ekspresi cytokine (IL-1b, TGF-β dan TNF-α) dan

menurunkan regulasi HSP70 pada usus (Hai, 2015). Probiotik beraksi dengan jalan

merefleksikan enzim-enzim seperti *alginate lyase*, amilase, dan protease dalam

peningkatan daya cerna pakan. Selain itu juga terjadi pembangkitan nutrisi esensial

misalnya asam lemak, biotin dan vitamin B12, yang mempunyai pengaruh dalam

peningkatan kesehatan ikan (Fyzul *et al.*, 2014).

Suplementasi dari pemberian probiotik akan terjadi peningkatan keasaman

usus dengan memproduksi asam laktat dan memperpendek rantai asam lemak.

Pemberian probiotik akan memfasilitasi dalam penyerapan besi dan juga mineral lain

seperti kalsium, magnesium, dan zinc untuk memperbaiki susunan tulang,



memproduksi vitamin, menurunkan komponen makanan yang sulit dicerna. (Merrifeld et al., 2010; Abd El-Rhman et al., 2009).

Probiotik genus *Bacillus* memiliki jangkauan yang luas terhadap enzim eksogenus yang secara rahasia dapat meningkatkan pertumbuhan. *Bacillus* mampu memecah karbohidrat dan protein, memproduksi vitamin K dan B₁₂ (Bagheri et al., 2008). *Bacillus* sp memproduksi vitamin K dan B₁₂ serta asam amino. Probiotik memproduksi enzim ekstraseluler seperti protease dan lipase. Pemberian *Bacillus pumilus* dalam waktu tertentu akan meningkatkan aktivitas hepatopankreas protease serta meningkatkan efisiensi pakan pada ikan kerapu (Liu et al., 2013).

2.11 Media Tumbuh Bakteri Probiotik

Komponen mayor seperti protein, lemak, dan karbohidrat dan minor seperti kalsium, besi, sodium, karotin, vitamin-E dan riboflavin banyak dijumpai pada sari kedelai yang dapat dijadikan media tumbuh bakteri *Bifidobacterium* yang di kultur pada suhu 30-37 °C (Maftei et al., 2012). *Bacillus* sp. mampu memanfaatkan asam urea dalam urin serta protein yang tidak terserap, asam amino, dan senyawa non protein nitrogen sebagai sumber nutrisi (Manin et al., 2012).

Bakteri asam laktat membutuhkan garam, nutrisi kompleks seperti peptida, asam amino, vitamin, purin, dan pirimidin yang banyak terdapat pada perasan jeruk dan perasan tomat (Mattarelli et al., 2014). Ishibashi et al. (1997), menambahkan serat dan oligosakarida mampu meningkatkan pertumbuhan *Bifidobacterium* sp. Bakteri membutuhkan mineral dan N organik sebagai nutrisi untuk pertumbuhan (Purwanta dan Mayrina, 2002).

Bakteri probiotik menyukai gula sederhana dengan mengandung sedikit nitrogen. Kandungan 100 gram limbah cair tahu terdiri dari protein 0.35 gr,

karbohidrat 0,85 gr, lemak 0,01 gr, selain itu juga mengandung vitamin dan mineral (Purwitasri *et al.*, 2004; Benedetti *et al.*, 2016). C_{org} dan N_{total} dapat digunakan sebagai sumber energi oleh bakteri dengan perbandingan 100 mg/L C_{org} : 10 mg/L N_{total} (10:1), sebesar 12,94 mmol : 1 mmol atau 15 mmols : 1 mmol, tergantung dengan kondisi kultur dan jenis bakteri (Wang *et al.*, 2016; Hulsen *et al.*, 2016; Touratier *et al.*, 1999). C:N rasio 10:1 µg atom/liter memiliki pertumbuhan sel bakteri akuatik yang optimal (Goldman *et al.*, 1987).

2.12 Limbah Cair Tahu (LCT)

Limbah cair tahu merupakan produk sampingan hasil dari proses pembuatan tahu yang tidak terpakai. Limbah cair tahu dihasilkan dari proses pencucian, perebusan, pengepresan, dan pencetakan tahu (Anggraini *et al.*, 2014). Limbah cair tahu merupakan produk buangan dengan kandungan nitrat dan fosfat yang tinggi sehingga sangat mempengaruhi lingkungan, terutama lingkungan perairan (Esti *et al.*, 2014). Produksi limbah cair tahu dapat lebih dari dua kali lipat karena dalam proses pembuatan tahu dibutuhkan kedelai dengan air 1:3 (Muchtadi, 2010).

Limbah cair tahu di peroleh dari proses pembuatan tahu yang memiliki kandungan kimia air sebanyak 99,34%, Abu 0,11%, Protein 1,73%, Lemak 0,63%, Nitrogen 0,05%, (Lestari *et al.*, 2013). Limbah cair tahu mengandung substrat organik dan secara alami dapat ditumbuhki oleh bakteri *photosynthetic* dalam kondisi *an aerobic* (Kim dan Lee, 2010). Limbah cair tahu dapat digunakan sebagai tempat aktivitas biologi *microorganism* dengan produk non-fermentasi yang menjadi sumber anti oksidan (Benedetti *et al.*, 2015).

2.13 Aplikasi Probiotik pada Akuakultur

Bakteri probiotik bermacam-macam yang ditemukan seperti: *Carnobacterium*

sp., *Vibrio alginolyticus* dan *Planococcus* sp. pada ikan bandeng (Aslamiyah, 2006).

Lactococcus lactis pada vanamei, *Vibrio SKT* pada udang windu (Basir dan Surianti,

2013; Widanarni et al., 2012), *Lactobacillus* sp., *Lactobacillus plantarum* (Triana et

al., 2006; Rizkiati et al., 2005), *Lactobacillus* sp., *Actinomycetes* sp. dan

Streptomyces sp. terdapat pada ikan nila (Putri et al., 2012). Menurut Ghazala et

al. (2010); Felis dan Dellaglio (2015), *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium*

bifidum, *Streptococcus faecium* dan *Bacillus subtilis* dapat dijadikan probiotik pada

ikan nila. Penggunaan *Paenibacillus polymyxa* (MTCC 122) (Gupta et al., 2014),

Bacillus licheniformis (Han et al., 2015), *Bacillus subtilis* secara nyata dapat

meningkatkan pertumbuhan, efisiensi pakan, meningkatkan respon imun spesifik

ikan nila terhadap *Aeromonas hidrophila*, *Sreptococcus iniae* dan *Vibrio harveyi*

(Iwashita et al., 2015).

Sederet bakteri dalam akuakultur dapat dijadikan probiotik seperti

Lactobacillus, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Shewanella*, *Bacillus*,

Aeromonas, *Saccharomyces*, *Vibrio* sp., *Enterobacter*, *Pseudomonas*, dan

Clostridium (Nayak, 2010). Penggunaan kombinasi *Micrococcus luteus* dan

Pseudomonas sp. (1:1) dengan kepadatan 0.3×10^7 sel/gr pada pakan dapat

meningkatkan resistensi terhadap *Aeromonas hydrophyla* (Abd El-Rhman et al.,

2009). Penggunaan probiotik *Vibrio alginolyticus* dengan kepadatan 10^8 Sel/ml yang

ditantang dengan *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio aguillarum* dan *Vibrio ordalii* dapat

meningkatkan kelulushidupan ikan salmon sebesar 18% (Austin et al., 1995). Bakteri

Vibrio dan *Pseudomonas* digunakan sebagai probiotik pada kekerangan, serta

Aeromonas dan *Enterobacter* pada ikan air tawar (Pandian et al., 2013).

Penggunaan suplementasi probiotik dalam pakan mampu meningkatkan pertumbuhan, respon imun, dan resistensi penyakit yang disebabkan *Aeromonas hydrophila* pada benih ikan mas *Cyprinus carpio* (Gupta *et al.*, 2014). Suplementasi *Vibrio* sp strain OY15 dengan kepadatan 10^3 CfU/ml secara nyata meningkatkan kelulushidupan dan laju metamorfosis larva kerang (*Crassostrea virginica*) (Kapareiko *et al.*, 2011). Penggunaan probiotik *Vibrio* spp dapat meningkatkan produksi sebesar 35% dan meningkatkan aktivitas antimikroba sebesar 94% di Ekuador (Gomez-gil *et al.*, 2000). Penggunaan probiotik dengan cara menambahkan pada pakan dapat mengontrol penyakit, sebagai antibiotik, meningkatkan laju pertumbuhan dan resistensi *juvenile* ikan nila terhadap beberapa infeksi bakteri patogen (Han *et al.*, 2015).

Suplementasi probiotik pada akuakultur secara praktis dilakukan dengan menambahkan pada pakan, baik pada saat pembuatan maupun setelah pakan itu jadi (pelleting/granulation dan extrusion) (Akhter *et al.*, 2015). Pemberian probiotik dapat dilakukan dengan *single probiotic* atau *combine probiotics*, ataupun dengan mengkombinasikan dengan prebiotik, imunostimulan atau produk alami tanaman (Fyzul *et al.*, 2014). Probiotik diberikan melalui pakan sebagai pakan tambahan yang ditambahkan dalam bentuk pellet, crumbles, granul, flake atau mikro enkapsulasi.

Penambahan probiotik dalam media budidaya (air) secara langsung dirasa kurang memberikan dampak yang nyata jika dibanding penggunaan melalui pakan (Hai, 2015).

2.14 Kualitas Air Pemeliharaan

2.14.1 Suhu

Terdapat dua alasan mengapa suhu memiliki dampak yang besar pada manajemen budidaya perairan dan produktifitas. Pertama karena ikan merupakan

hewan polikiloterem yaitu hewan yang aktifitas metabolisme hidupnya tergantung pada suhu lingkungan. Kedua, perubahan dalam suhu air akan menghasilkan variasi suplai oksigen karena suhu yang tinggi akan menyebabkan terganggunya difusi oksigen dan akan mempengaruhi pertumbuhan ikan (Besson et al., 2016).

Nilai kualitas air, suhu dan salinitas adalah salah satu kunci dari proses budidaya ikan. Beberapa ikan akan lebih toleran terhadap perubahan suhu dan salinitas. Perubahan lingkungan perairan akan merubah susunan genotip pada beberapa spesies ikan (Abass et al., 2016). Embrio ikan akan sangat mudah terpengaruh oleh suhu. Menurut Caamal-monsreal et al. (2016), suhu dapat mempengaruhi daya tetas embrio, morfologi dan karakteristik embrio.

2.14.2 Dissolved oxygen (DO)

Dalam budidaya ikan intensif, dapat diekspos beberapa penyebab stress seperti fluktuasi dari konsentrasi *dissolved oxygen* (DO). DO diketahui menjadi penyebab terjadinya stress pada ikan, karena terjadinya peningkatan transport oksigen yang ketat dalam membran permeabilitas, peningkatan permeabilitas akan terjadi hipoksia yang akan menurunkan pertumbuhan dan daya cerna serta tingkat konsumsi oksigen (Tran-ngoc et al., 2016; Abass et al., 2016).

Perbedaan konsentrasi oksigen terlarut akan mempengaruhi osmolalitas hemolip, konsentrasi garam, keseimbangan asam-basa, dan tingkat dari laktase dan glukosa sebesar 35‰ (Cheng et al., 2004). Menurut Buentello et al. (2000), tingkat saturasi oksigen dalam perairan secara nyata akan mempengaruhi konsumsi pakan, daya cerna dan pertumbuhan.

2.14.3 pH

pH merupakan salah satu parameter penyebab stress ikan. Beberapa studi

menjelaskan bahwa perubahan pH dapat membunuh ikan dalam sistem budidaya.

Biota akuatik tidak dapat menyesuaikan diri dengan perubahan pH yang mendadak,

karena mereka tidak dapat mempertahankan asam-basa dan regulasi serta eksresi

amonia dalam tubuh (Zahangir et al., 2015).

pH dalam budidaya akan dipengaruhi oleh air hujan, polutan dalam air.

Perubahan pH dalam media budidaya akan mengganggu osmoreguasi, produksi

enzim sehingga memudahkan serangan patogen (Liu et al., 2015). pH akan

mempengaruhi aktifitas enzim protease, mempengaruhi produktifitas enzim dalam

pankreas, sehingga sistem pencernaan pada ikan terganggu (Krogdahl et al., 2015).

3.1 Landasan Teori Penelitian

Sistem akuakultur sangat erat kaitannya dengan faktor eksternal seperti pakan, Respon pakan dimulai melalui saluran pencernaan seperti mulut, kerongkongan, lambung, usus dan anus hingga organ pencernaan seperti hati dan pankreas. Di dalam usus akan terjadi reaksi enzimatis yang dilakukan oleh mikroba usus yang akan merombak senyawa kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana sehingga terjadi penyerapan nutrient di dalam usus.

Pemberian pakan dengan kualitas dan kuantitas yang tinggi sangat diperlukan sebagai peningkat stimulus terhadap stress, imunostimulant, meningkatkan kelulushidupan, meningkatkan efisiensi pakan hingga laju pertumbuhan. Oleh karena itu, diperlukan rekayasa untuk meningkatkan kualitas pakan dalam hal ini dengan bantuan mikroflora usus yang baik atau bakteri probiotik. Secara alami bakteri probiotik dapat diisolasi dari usus ikan (*Indigenous*) sebagai indikasi bahwa bakteri tersebut mampu menempel pada dinding usus ikan yang nantinya bakteri probiotik akan menghasilkan *exogenous* enzim untuk pencernaan pakan seperti amilase, protease, dan lipase. Sehingga proses enzimatis lebih cepat dan efisiensi pakans akan meningkat, peningkattkan efisiensi pakan akan secara otomatis meningkatkan laju pertumbuhan (Afriansyah *et al.*, 2014; Ghazala *et al.*, 2010; Hai, 2015; Del'Duca *et al.*, 2013). Konsentrasi bakteri probiotik yang sesuai akan meningkatkan respon imun spesifik, menurunkan stress dan meningkatkan kadar hemoglobin (Telli *et al.*, 2014). Landasan Teori Penelitian di atas didasarkan pada beberapa penelitian terdahulu yang dapat dilihat pada Tabel 1 dibawah ini.

3. KERANGKA PENELITIAN

Tabel 1. Penelitian Terdahulu

Tahun/Jenis Jurnal	Penulis	Judul	Hasil	Yang belum dilakukan
Aquaculture. Elsevier. 2013	Del'Duca <i>et al.</i> ,	Evaluation of the presence and efficiency of potential probiotic bacteria in the gut of tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) using the fluorescent in situ hybridization technique	Dua bakteri kandidat probiotik diperoleh yaitu <i>Bacillus sp</i> dan <i>Enterococcus sp</i> , Kedua bakteri tersebut terbukti mampu menjadi daya hambat pertumbuhan bakteri <i>Aeromonas sp</i> dan <i>Pseudomonas sp</i>	Menggunakan Bakteri jenis <i>Bacillus sp</i> dan <i>Enterococcus sp</i> untuk mengevaluasi pertumbuhan ikan nila
Fish & Shelfish Immunology. Elsevier. 2016	Standen <i>et al.</i> ,	Dietary administration of a commercial mixed-species probiotic improves growth performance and modulates the intestinal immunity of tilapia, <i>Oreochromis niloticus</i>	Jenis Probiotik (Pro-3) dapat meningkatkan pertumbuhan dan secara aktif dapat meningkatkan sistem imun	Membuat Probiotik dari bahan yang baru sehingga dapat menggantikan probiotik komersial, membandingkan probiotik buatan Sendiri dengan Probiotik yang sudah dikomersialkan
Fish & Shelfish Immunology. Elsevier. 2014	Telli <i>et al.</i> ,	Dietary administration of <i>Bacillus subtilis</i> on hematology and non-specific immunity of Nile tilapia <i>Oreochromis niloticus</i> Raised at different stocking densities	Dengan konsentrasi bakteri <i>Bacillus subtilis</i> <i>5X10⁶ cfu/g pakan</i> dapat meningkatkan respon imun spesifik, menurunkan stress pada kepadatan tinggi ,meningkatkan kadar haemoglobin.	Perbedaan Dosis <i>Bacillus subtilis</i> terhadap pertumbuhan.

Fish & Shelfish Immunology. Elsevier. 2013	Standen et al.,	Probiotic <i>Pediococcus acidilactici</i> modulates both localised intestinal- and peripheral-immunity in tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Pengunaan bakteri probiotik jenis <i>Pediococcus acidilactici</i> Memperluas jaringan sel imunitas (meningkatkan respon imun) tidak berpengaruh terhadap performa pertumbuhan.	Perlu dicari bakteri probiotik yang dapat meningkatkan pertumbuhan, serta FCR ikan Nila.
Fish & Shelfish Immunology. Elsevier 2014	Gupta Akhil, Promita Gupta. Asha Dhawan.	Dietary supplementation of probiotics affects Growth, immune response and disease resistance of Cyprinus carpio fry	Membandingkan 3 bakteri kandidat probiotik yaitu <i>Bacillus coagulans</i>, <i>B. licheniformis</i>, <i>Paenibacillus polymixa</i>. Didapatkan Bakteri kandidat probiotik terbaik <i>Panenibacillus polymixa</i> .	Kombinasi antar beberapa bakteri yang digabung menjadi satu dijadikan sebagai kandidat bakteri probiotik.
Aquaculture. Elsevier. 2012	Heo Won-Seok et al.,	Effect of dietary probiotic, <i>Lactococcus lactis</i> subsp. Lactis I2, supplementation on growth and immune response of olive flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	Pemberian <i>Lactococcus lactis</i> I2 pada pakan dengan kepadatan 10^8 CFU/g dapat meningkatkan laju pertumbuhan ikan sebelah selama 5 minggu percobaan. Hasil uji tantang terhadap <i>Streptococcus iniae</i> secara injeksi selama 9 hari menunjukkan tingkat kelulushidupan 90%.	Mendapatkan bakteri kandidat probiotik lain yang dapat meningkatkan laju pertumbuhan serta mempunyai respon imunitas yang baik pada berbagai macam bakteri patogen.

3.2 Kerangka Konsep Penelitian dan Hipotesis

3.2.1 Kerangka Konsep Penelitian

Budiaya ikan nila secara intensif akan meningkatkan penggunaan pakan

komersil. Kebutuhan akan pakan menyedot 60-70% biaya produksi. Ikan hanya

mampu mencerna sekitar 20-25% protein dari nutrisi pakan yang diberikan. Pakan

sebagian akan menjadi daging dan sebagian lagi terbuang di lingkungan budidaya.

Tingginya buangan pakan disebabkan oleh rendahnya efisiensi pakan ikan.

Kemampuan ikan dalam mencerna pakan yang diberikan dapat ditingkatkan dengan

penambahan probiotik. Probiotik dapat menjadi agen antibiotik, agen hidrolisis

lemak, protein, karbohidrat dan sebagai pemberi jalan pintas dalam pencernaan

pakan oleh ikan, serta meningkatkan kualitas air.

Probiotik akan menempel pada dinding usus, sehingga akan menambah

jumlah bakteri dalam usus. Memperluas jaringan sel imunitas (meningkatkan respon

imun), dengan konsentrasi bakteri probiotik tertentu dapat meningkatkan respon

imun spesifik, menurunkan stress pada kepadatan tinggi.

Kolonisasi bakteri probiotik pada dinding usus akan meningkatkan jumlah

enzim ekstraseluler pencernaan (protease, lipase dan amilase), yang akan

mempercepat hidrolisis senyawa kompleks seperti protein, lemak dan karbohidrat

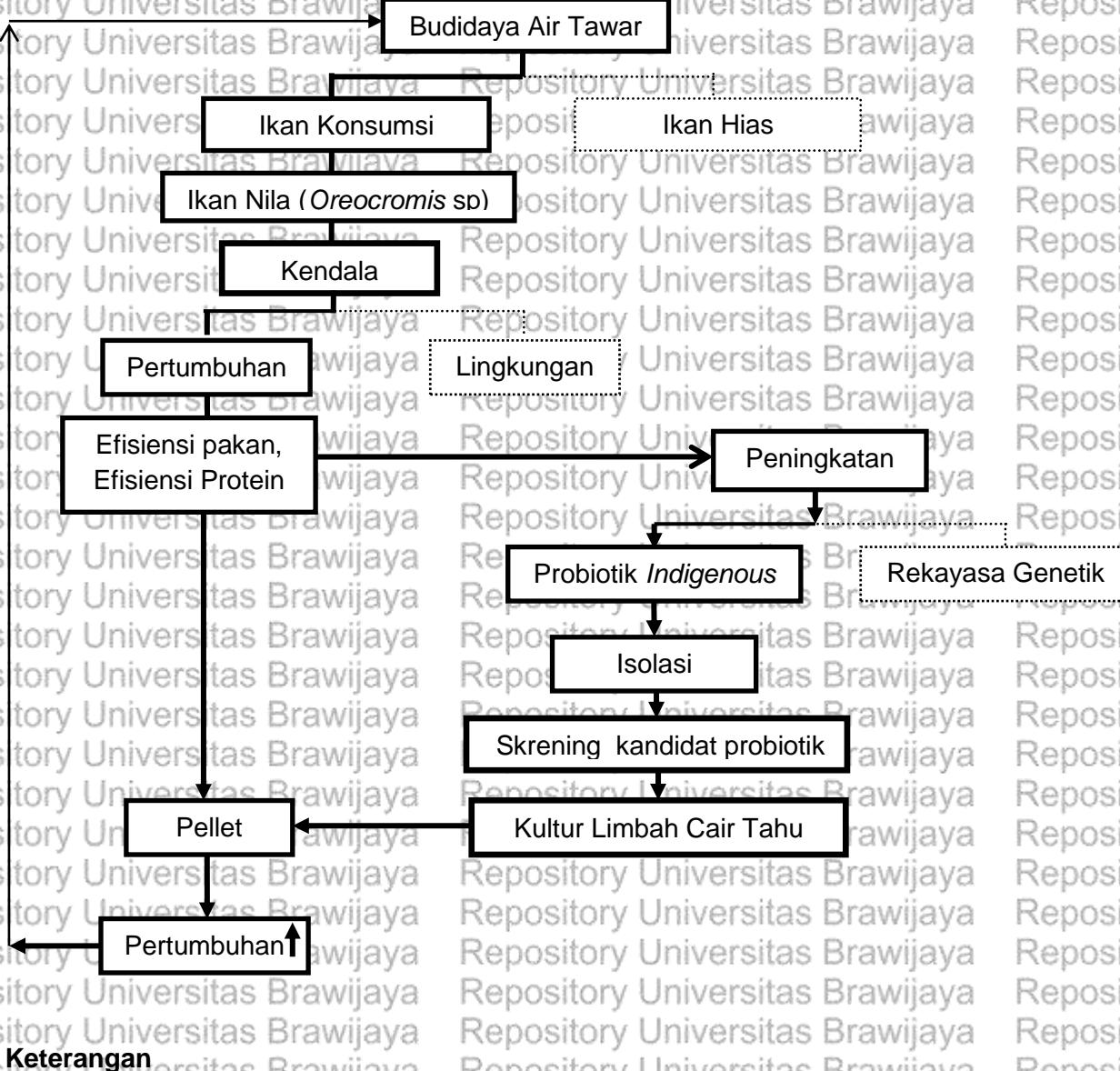
yang merupakan sumber energi bagi ikan. Hidrolisis akan meningkatkan efisiensi

pakan ikan. Efisiensi pakan yang meningkat akan meningkatkan efisiensi protein

sehingga laju pertumbuhan akan dapat dipercepat maka dapat menurunkan nilai

konversi pakan dan meningkatkan kualitas air. Kerangka Konsep Penelitian dapat

dilihat pada Gambar 2.

**Gambar 2:** Kerangka Konsep penelitian

3.2.2 Hipotesis

Dari kerangka konsep diatas kita dapat mengambil hipotesis penelitian

diantarnya sebagai berikut:

Hipotesis

- Terdapat bakteri *indigenous* sebagai kandidat probiotik.
- Limbah cair tahu dapat digunakan sebagai media pengkaya probiotik dengan penambahan C:N rasio.
- Pemberian probiotik *indigenous* dapat meningkatkan laju pertumbuhan spesifikikan nila (*Oreochromis* sp).

3.3 Kerangka Operasional Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam dua tahap yang berbeda. Secara lengkap dapat dilihat pada Gambar 3. Tahap pertama secara *in vivo* dengan melakukan isolasi bakteri kandidat probiotik. Setelah memperkaya (melakukan kultur) bakteri kandidat tersebut dalam limbah cair tahu, dilakukan uji viabilitas secara *in vitro* pada pakan dengan perlakuan jama simpan (0 hari, 1 hari, 3 hari). Tahap terakhir uji *in vivo* dengan menambahkan pada pakan ikan. Deskripsi secara operasional sebagai berikut. Ikan nila (*Oreochromis* sp) dipersiapkan diambil dari wadah pemeliharaan secara hati-hati lalu ditimbang berat dan diukur panjang tubuhnya. Selanjutnya yaitu isolasi bakteri kandidat probiotik pada usus (bagian usus setelah lambung hingga anus). Alasan mengapa dilakukan pengambilan di usus karena proses pencernaan dan penyerapan nutrisi berlangsung di usus dan untuk memastikan bahwa bakteri tersebut mampu hidup dan bertahan dalam usus (mampu bertahan dalam pH rendah). Usus ikan diambil sebanyak 1 gr menggunakan *sectio set* dan selanjutnya dihaluskan menggunakan mortal dan alu yang telah diaseptiskan setelah itu dilarutkan dalam 9 ml Nafis steril dan divortex kemudian dilakukan pengenceran sampai 10^8 dengan cara mengambil pada tiap-tiap tabung reaksi sebanyak 1 ml

yang dilakukan secara seri dengan kehati-hatian dan dilakukan diatas bunsen yang menyala, selanjutnya dilakukan penanaman pada media MRS agar secara *pour plate* dan setelah itu ditutup dengan menggunakan plastik warp atau menggunakan kertas dilakukan inkubasi pada suhu 35°C selama 24-48 jam. Selanjutnya dilakukan perhitungan jumlah koloni yang tumbuh dan kemudian dilakukan seleksi dan pengelompokan berdasarkan bentuk, warna, ukuran, serta tepi koloni. Setelah itu dilakukan isolasi dengan cara mengambil 1 koloni yang paling banyak tumbuh dalam media MRS agar menggunakan jarum ose dan dipindahkan isolat koloni tunggal dengan metode goresan kuadran.

Selanjutnya dilakukan uji koloni tunggal (*screening candidat probiotic*) dengan menguji morfologi meliputi bentuk sel dan jenis gram bakteri, menggunakan dua pewarna yaitu kristal ungu dan saframin. uji patogenitas (termasuk bakteri patogen atau bukan) dilakukan dengan menggunakan media selektif *Blood Agar*, uji antibakteri (*antagonism test*) dengan menggunakan uji cakram menggunakan bakteri tantang yaitu *Aeromonas hydrophila* dan *Edwardsiella tarda*, kedua bakteri ini dipilih karena mereka merupakan bakteri patogen yang menghuni dua zona yang berbeda. Bakteri *Aeromonas* merupakan bakteri yang hidup pada permukaan dan bagian tengah tambak atau kolam, sedangkan bakteri *E. coli* hidup pada bagian dasar kolam atau tambak yang mengeluarkan H₂S. Uji enzim ekstraselluler dengan media selektif yang kemudian ditambahkan cakram, dan karakteristik pertumbuhan menggunakan media TSB yang selanjutnya dilakukan pengamatan pertumbuhan secara densitas menggunakan spektofotometer pada panjang gelombang 600 Å

(NavinChandran et al., 2014; Del'Duca et al., 2013; Ferreira et al., 2015; Geraylou et al., 2013).

Hasil uji skrining bakteri indigen terbaik yang selanjutnya disebut kandidat probiotik karena sudah hampir memenuhi kriteria probiotik kemudian dilakukan identifikasi bakteri kandidat dengan metode konvensional meliputi uji morfologi, biokimia dan fisiologi menggunakan Cowan (1985) (Nusyirwani et al., 2011).

Selanjutnya dilakukan pengkayaan pada media limbah cair tahu hal ini merujuk pada keberhasilan Delev et al. (2006), yang memanfaatkan limbah cair keju sebagai media probiotik.

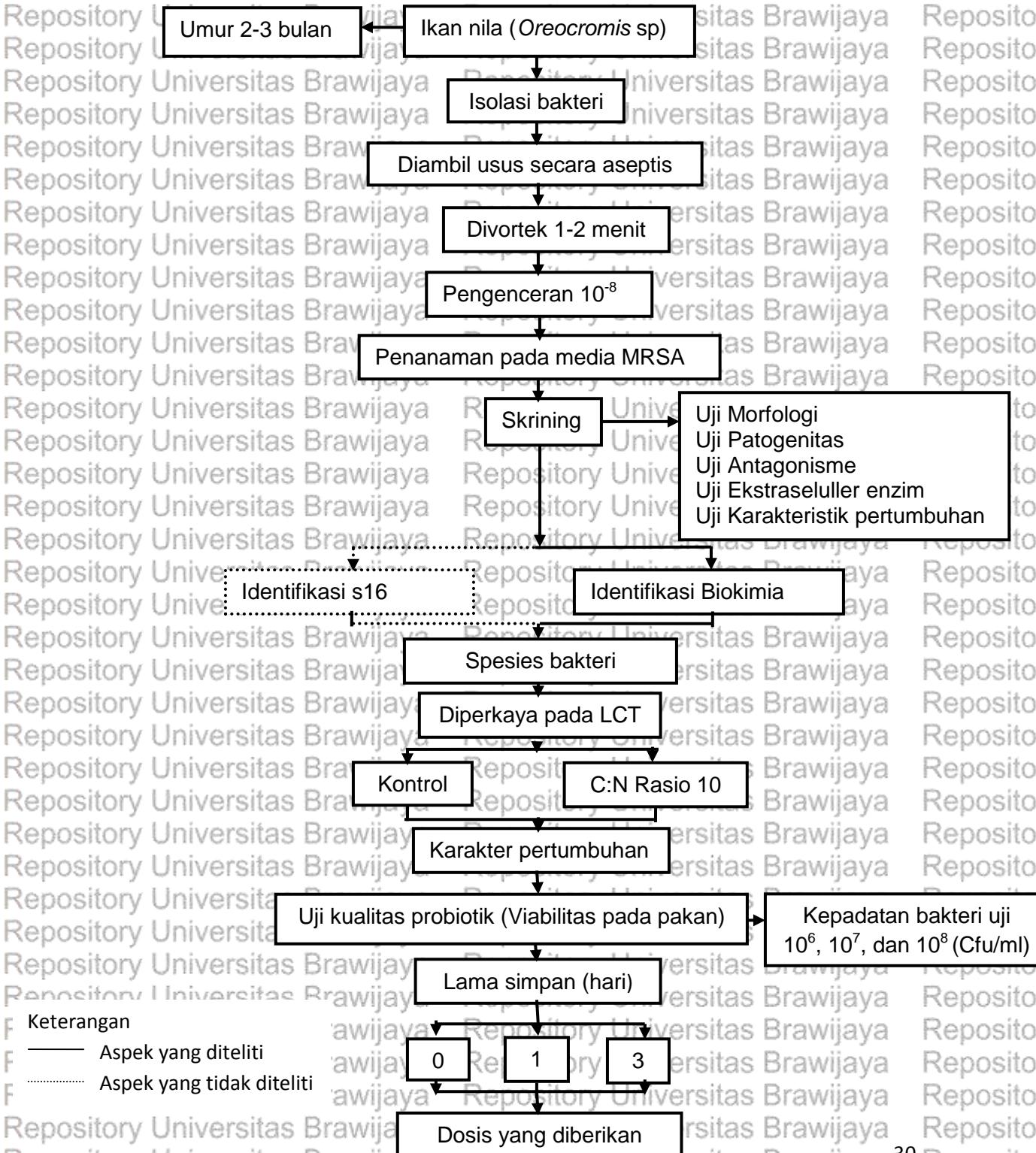
Uji *in vitro* berlanjut dengan melakukan kultur (memperkaya) bakteri kandidat probiotik pada media limbah cair tahu dengan membandingkan karakteristik pertumbuhan pada media LCT kontrol dan LCT dengan C:N rasio 10:1. Hasil karakterisasi pertumbuhan tersebut didapatkan fase-fase pertumbuhan. Fase pertumbuhan yang diambil yaitu pada fase eksponensial kemudian ditanam pada pakan. Setelah ditanam pada pakan kemudian dilakukan uji viabilitas bakteri indigen secara *in vitro* dengan daya simpan 0 hari, 1 hari, dan 3 hari. Uji viabilitas digunakan untuk mengetahui apakah bakteri indigen kandidat probiotik mampu bertahan hidup pada pakan pellet dengan masa simpan yang berbeda. Keberhasilan dalam uji viabilitas dilakukan dengan menghitung jumlah bakteri yang tumbuh dengan metode TPC. Hasil uji viabilitas didapatkan dosis terbaik yang selanjutnya akan diberikan pada ikan melalui pakan (Delev et al., 2006; Ferreira et al., 2015; Merrifield et al., 2010).

Tahap ke- 2 uji *in vivo* akan dilakukan pemberian bakteri indigen kandidat probiotik pada ikan melalui pakan dengan cara menambahkan sebanyak 1 ml/gr pakan dari hasil dosis terbaik pada uji viabilitas menggunakan mikropipet steril.

Pemeliharaan dilakukan selama 30 hari masa pemeliharaan kemudian dilakukan perhitungan dan analisa Kelulushidupan, Laju pertumbuhan spesifik, konversi pakan,

3.3.1 Kerangka Operasional Tahap 1

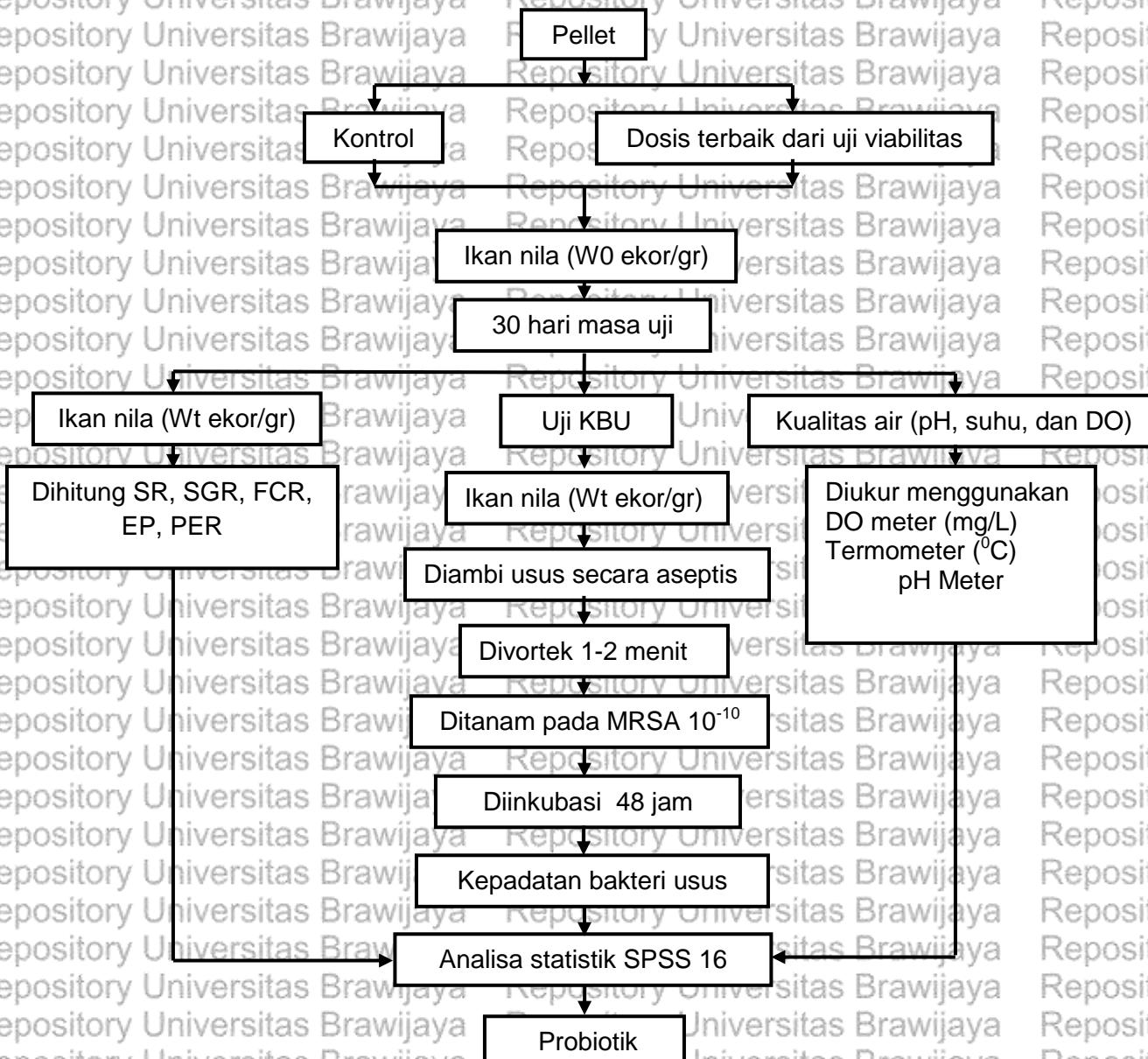
Karakter isolasi bakteri *indigenous* kandidat probiotik dan diperkaya pada limbah cair tahu (Delev *et al.*, 2006; NavinChandran *et al.*, 2014).



Gambar 3. Kerangka operasional penelitian

3.3.1 Kerangka Operasional Tahap 2

Uji *in-vitro* bakteri kandidat probiotik pada pakan dengan dosis yang telah didapatkan pada uji viabilitas dan dilakukan uji adhesive bakteri Kandidat probiotik secara *in-vivo* (Wu *et al.*, 2014; Telli *et al.*, 2014; Gupta *et al.*, 2014; Molina *et al.*, 2009; Del'Duca *et al.*, 2013; Fereira *et al.*, 2015; Fuller R. 1989; Gilberg *et al.*, 1995; Hai, 2015).



Gambar 4. Kerangka operasional penelitian



3.4 Kebaruan Penelitian

Kebaruan dari penelitian ini adalah formula limbah cair tahu sebagai media pengkaya bakteri kandidat probiotik dalam upaya memanfaatkan kandungan nutrisi limbah cair tahu dan mendapatkan bakteri indigen kandidat probiotik yang paling sesuai pada ikan nila (*Oreochromis sp*) dalam kaitanya pada laju pertumbuhan spesifik, kelulushidupan, *feed conversio ratio*, Efisiensi pakan, Rasio efisiensi protein.

3.5 Strategi Publikasi

Publikasi hasil riset ini akan dibagi 2 tema, untuk jadwal rencana publikasi dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Strategi Publikasi

No.	Judul	Bulan	Jurnal	Kategori
1.	Skrining bakteri indigen ikan nila (<i>Oreochromis sp.</i>) sebagai kandidat probiotik	Desember 2016	Jurnal Indonesia	Akuakultur

4. MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1 Materi Penelitian

4.1.1 Alat Penelitian

Peralatan yang
Dibawah ini :

Tabel 4. Peralatan dan Fungsi

Alat	Fungsi
Sectio set	Membedah dan mengambil usus ikan
Mortal dan Alu	Menumbuk dan menghaluskan usus
Vortek	Menghomogenkan usus dalam tabung reaksi
Tabung Reaksi	Tempat mengencerkan objek (usus ikan)
Cawan Petri	Tempat menanam dan menginkubasi objek (bakteri indigen kandidat probiotik)
Jarum Ose	Mengisolasi dan memindahkan koloni yang tumbuh pada cawan petri
<i>Colony Counter</i>	Menghitung Jumlah koloni yang tumbuh pada media dalam cawan petri
Timbangan Digital	Menimbang sejumlah media dan bahan yang digunakan
Rak Tabung reaksi	Tempat meletakkan Tabung reaksi pada seri pengenceran
Bunsen	Sumber pemanas (api) sebagai tindakan aseptis
Objek dan cover glass	Tempat membuat dan menutup preparat bakteri pada saat pewarnaan gram
Autoclave	Tempat dan Alat sterilisasi
Spektfotometer	Mengukur densitas bakteri
Pipet tetes dan Pipet volume	Mengambil sejumlah larutan atau media yang diinginkan
Bola hisap	Mempermudah mengambil sejumlah media cair yang diinginkan
Erlenmayer	Tempat membuat dan menghomogenkan media tumbuh bakteri
Hot Plate	Alat pemanas media
<i>Magnetic sterer</i>	Pengaduk dan mempercepat mohogenisasi media
Sendok bahan	Mengambil bahan dalam sejumlah yang diinginkan
Inkubator	Tempat inkubasi dalam sejumlah suhu yang diinginkan
Nampan	Meletakkan dan mempermudah memindahkan barang
<i>Laminary Air Flow</i>	Tempat membuat, menuang dan melakukan pengambilan koloni
Pipa dan kran air	Untuk mengalirkan air dalam wadah akuarium

Alat	Fungsi
Destruktor	Mendestruksi media setelah digunakan
Gelas ukur	Mengukur sejumlah akuades yang diperlukan
Beaker glass	Menghomogenkan media
Mikroskop	Melihat dan mengamati bakteri pada preparat
Jangka sorong digital	Mengukur diameter zona bening
Lemari Pendingin	Menyimpan media pada suhu dingin
Mikropipet	Mengambil sejumlah kecil media cair pada seri pengenceran dan penanaman
Blue tube	Tempat sejumlah kecil media cair pada penggunaan mikropipet
Yellow tube	Tempat sejumlah kecil (mikro) media cair pada penggunaan mikropipet dalam uji antagonism dan enzim ekstraseluler
Botol Falcon	Tempat sejumlah tertentu media cair pada uji karakterisasi pertumbuhan
Akuarium	Tempat pemeliharaan ikan pada proses <i>in vivo</i>
40X30X30 cm	

4.1.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 5 berikut ini:

Tabel 5. Bahan-bahan yang digunakan dalam Penelitian

	Bahan	Fungsi
Repos	Ikan nila (<i>Oreochromis sp</i>)	Objek ukuran 7 cm yang digunakan dan diambil ususnya untuk mendapatkan bakteri indigen
Repos	Media MRSA (<i>De Man Rogosa Sharpe Agar</i>)	Media tanam sebagai tempat hidup bakteri indigen dalam bentuk padat
Repos	Media TSB (<i>Tryptic Soy Broth</i>)	Media tanam sebagai tempat hidup bakteri indigen dalam bentuk cair
Repos	Natrium fisiologis (<i>NaFis</i>)	Media dalam pengenceran
Repos	Akuades	Pelarut dalam membuat media Agar dan Broth
Repos	Kertas Cakram	Tempat meletakkan atau menanam bakteri kandidat dalam uji antagonisme, uji ekstraselluler enzim.
Repos	Alkohol 70%	Pengkondisian aseptis
Repos	Alkohol 95%	Pelarut Kristal ungu dalam uji pewarnaan gram
Repos	Spiritus	Bahan bakar Bunsen
Repos	Safranin	Indikator pewarna merah dalam uji pewarnaan gram
Repos	Kristal Ungu	Indikator pewarna ungu dalam uji pewarnaan gram
Repos	Lugol	Pengikat warna ungu dalam uji pewarnaan gram
Repos	Karet gelang	Mengikat dan penutup media

Bahan	Fungsi	
Alumunium foil	Penutup dan pelapis mulut tabung reaksi dan erlenmayer	Repository
Kertas Label	Menandai dan menamai setiap preparat dan seri pengenceran serta media tanam bakteri	Repository
Plastik warp	Penutup atau pembungkus cawan petri pada saat inkubasi bakteri	Repository
Casein	Sumber protein pada uji ekstraselluler enzim	Repository
Pati (Starch)	Sumber karbohidrat pada uji ekstraselluler enzim dan sumber karbon (C) pada penyesuaian C:N Rasio kulur pada limbah cair tahu	Repository
Minyak ikan	Sumber Lipid pada uji ekstraselluler enzim	Repository
Media Backto Agar (Agar)	Media yang digunakan uji ekstraselluler enzim protease	Repository
Media Nutrient Agar (NA)	Media yang digunakan uji ekstraselluer enzim lipase dan amylase	Repository
Kertas penutup	Penutup cawan petri pada saat sterilisasi	Repository
Limbah cair tahu	Limbah yang digunakan dan dimanfaatkan sebagai media hidup dan tumbuh bakteri kandidat probiotik	Repository
Pupuk ZA	Suber Nitrogen (N) pada penyesuaian C:N Rasio kultur pada limbah cair tahu	Repository
Iodine	Pengikat enzim amylase pada uji ekstraselluler enzim	Repository
Neutral Red	Pengikat enzim lipase pada uji ekstraselluler enzim	Repository
KOH 3%	Indentifikasi sifat gram secara biokimia	Repository
Tetes katalase (H_2O_2)	Indentifikasi sifat katalase secara biokimia	Repository
Bactident	Indikator sifat oksidase pada indentifikasi secara biokimia	Repository
Osidase	Identifikasi kemampuan bakteri dalam menghasilkan produk hasil fermentasi serta sifatnya	Repository
TSIA	Indenifikasi sifat fermentatif atau oksdatif dari bakteri	Repository
Parafin cair steril	Mengetahui kemampuan bakteri dalam menghidrolisis karbohidrat	Repository
Fermentasi karbohidrat (turunan karbohidrat)		Repository
Gelatin	Kemampuan secara biokimia bakteri memanfaatkan gelatin	Repository
MR (Methyl red) dan VP (Voges Proskauer)	Kemampuan secara biokimia bakteri dalam mensintesa pereagen MR dan VP	Repository
MIO (Motility, Ornithin dan Indol)	Mengetahui kemampuan bakteri dalam bergerak	Repository
Reagen Kovacs	Reagen Indol pada uji Indol	Repository
Fenilalanin	Mengetahui Kemampuan mensinteis besi dari bakteri	Repository
FeCl ₃ 10%	Reagen uji fenilalanin	Repository
Urease	Mengetahui kemampuan bakteri dalam memanfaatkan N	Repository
Simmon's citrate	Mengetahui kemampuan dalam menghasilkan asam sitrat	Repository

4.2 Metode Penelitian (Deskriptif Eksploratif dan Eksperimen)

Metode penelitian deskriptif eksploratif yaitu proses menganalisa dan

memperbarui data dalam pengumpulannya, disajikan secara sistemik untuk

pemahaman yang lebih mudah. Penelitian deskriptif eksploratif menurut Arikunto

(2002), yaitu suatu jenis penelitian yang menjelaskan fenomena dalam suatu

penelitian dengan menemukan hal yang baru penyebab suatu gejala. Menurut

Suryabrata, (2006); Narbuko dan Ahmadi, (2007), penelitian deskriptif eksploratif

adalah metode menemukan hal baru sebab-sebab kemungkinan hubungan saling

keterkaitan dengan penjelasan yang rinci kepada satu atau lebih kelompok faktor

yang saling terkait.

Metode deskriptif eksploratif digunakan untuk menemukan dan menjelaskan

kandungan C:N rasio limbah cair tahu serta karakter bakteri kandidat probiotik.

Sedangkan untuk menjelaskan pengaruh penggunaan limbah cair tahu sebagai

media pengkaya bakteri kandidat probiotik dan pengaruh pemberian probiotik pada

ikan nila melalui pakan selama 30 hari digunakan metode eksperimen. Menurut

Suryana (2010), metode eksperimen yaitu suatu metode penelitian yang digunakan

untuk menyelidiki kemungkinan sebab akibat dengan cara mengenakan kepada

suatu atau lebih kondisi perlakuan dan membandingkan hasilnya dengan kontrol.

Metode dan variabel yang akan digunakan dalam penelitian dapat dilihat

pada Tabel 5.

Tabel 5. Metode dan Variabel Penelitian

Repos	No.	Topik Penelitian	Metode	Variabel	Hasil
Repos	1.	Uji kandungan C_{org} , N_{total} dan P_{total}	Deskriptif	C:N:P rasio	Kandungan C_{org} , N_{total} dan P_{total}
Repos	2.	Identifikasi Kandidat Probiotik	Eksploratif	<ul style="list-style-type: none">• Uji Gram• Uji <i>Pathogenitas</i>• Uji Antagonisme• <i>Extraselular enzyme test</i>• <i>Growth characteristics test</i>	Bakteri Indigenous Kandidat Probiotik
Repos	3.	Pengkayaan pada media limbah cair tahu	Eksperimen	<ul style="list-style-type: none">• Perkembangbiakan dan kelimpahan pada media kultur• Viabilitas pada pakan	Kelimpahan dan dosis yang dituju
Repos	4.	Pengaruh pemberian probiotik pada ikan nila melalui pakan selama 30 hari	Eksperimen	<ul style="list-style-type: none">• SGR• FCR• SR• Efisisensi pakan• Rasio Efisiensi protein• Retensi Protein	Data statistik
Repos	5.	Total bakteri <i>indigenous</i>	Eksperimen	- Kelimpahan bakteri <i>indigenous</i>	Jumlah koloni bakteri <i>indigenous</i>

4.3 Sampel dan Rancangan Penelitian

4.3.1 Sampel Penelitian

a. Ikan uji

Ikan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah benih ikan nila (*Oreochromis sp*) yang diperoleh dari balai budidaya air tawar Punten. Jumlah benih ikan nila yang digunakan sebanyak 300 ekor dengan berat tubuh rata-rata 7,6 gr, panjang rata-rata 9 cm dan umur ikan 3 bulans

b. Limbah cair tahu (LCT)

Sampel LCT diambil dari industri pengolahan tahu skala rumah tangga di

Desa Catak Gayam, Kecamatan Mojowarno, Kabupaten Jombang. Secara langsung

dengan cara di siapkan wadah untuk menampung sampel sampai 2 liter. Jurigen air

sebelumnya dibersihkan menggunakan klorine untuk menghindari kontaminasi oleh

mikroba yang ada pada jurigen.

c. Pakan

Pakan yang diberikan untuk benih ikan nila (*Oreochromis sp*) adalah pellet

dengan merk X yang telah diperkaya dengan probiotik kandungan protein 30,4%

(Lampiran 2). Pakan diberikan 2 kali sehari pada pagi dan sore hari dengan rasio

pemberian pakan 5% dari biomassa ikan.

d. Wadah Penelitian

Tempat pemeliharaan benih ikan nila (*Oreochromis sp*) adalah akuarium

ukuran 40x30x30 cm dengan ketinggian air 20 cm.

4.3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap

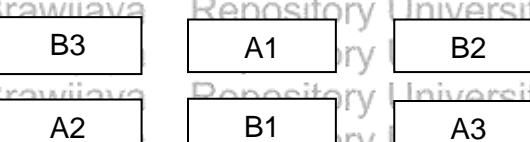
(RAL) yang terdiri dari 2 perlakuan 3 kali ulangan, sebagai berikut:

A : Tanpa penambahan probiotik

B : Penambahan probiotik dengan dosis 10^7 cfu/gr hasil uji viabilitas.

Denah penelitian yang akan dilakukan adalah dengan cara acak, dapat dilihat pada

Gambar 5, sebagai berikut:



Gambar 5. Denah Penelitian

4.4 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian telah dilaksanakan pada bulan Juli hingga November 2016 di

Laboratorium Budidaya Perairan Divisi Penyakit dan Kesehatan Ikan, dan

Laboratorium Divisi Reproduksi Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan.

Laboratorium Balai Karantina Ikan Kelas 1 Surabaya 2, dan Balai Penelitian

Tanaman Aneka kacang dari Ubi (Balitkabi) Malang.

4.5 Prosedur Penelitian

4.5.1 Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan meliputi uji kandungan C_{org}, N_{total} dan P dengan

metode Walkley dan Balck dan Identifikasi kandidat probiotik dilakukan dengan

metode biokimia menggunakan buku Cowan And Steel's Manual For The

Identification Of Medical Bacteria 3rd Edition (Cowan, 1985). Dari hasil penelitian

pendahuluan didapatkan, kandungan C_{org}, N_{total} dan P dan bakteri kandidat probiotik

secara spesifik.

4.5.2 Penelitian Inti

Penelitian inti bertujuan untuk mengetahui perbandingan kontrol dengan

pemberian probiotik dengan dosis 10⁷ cfu/gr dalam peningkatan laju pertumbuhan

spesifik ikan nila (*Oreochromis sp*) selain itu dilakukan pula pengamatan

kelulushidupan, konversi pakan, efisiensi pakan, rasio efisiensi protein, retensi

protein serta kelimpahan bakteri usus.

4.6 Kegiatan Penelitian

4.6.1 Persiapan dan Skrining Bakteri Probiotik

1. Isolasi Bakteri *Indigenous* Kandidat Probiotik

Usus ikan nila diambil pada bagian usus awal hingga anus menggunakan

section set, setelah itu ditimbang sebanyak 1 gr dengan menggunakan timbangan

digital, lalu ditumbuk sampai halus menggunakan mortal dan alu, selanjutnya dimasukkan dalam tabung reaksi yang telah berisi 9 ml Nafis setelah itu divortex selama 2 menit untuk menghomogenkan, kemudian dilakukan pengenceran sampai 10^{-8} (Lampiran 3) atau sampai hasil yang ditanam pada media MRSA dalam cawan petri bisa dihitung jumlah koloninya dan dilakukan pengulangan penuangan dua kali (secara *duplo*). Dipilih dan diambil sebanyak 100se koloni untuk dilakukan pemurnian berdasarkan tepi koloni, warna koloni, permukaan koloni dan bentuk koloni. Dipilih koloni dengan jumlah yang paling banyak, karena semakin banyak koloni artinya bakteri tersebut mampu bertahan dan hidup dalam saluran pencernaan khususnya usus. Kemudian dilakukan penanaman dengan cara mengambil 1 ml media pengencer usus pada tabung reaksi menggunakan mikropipet pada hasil pengenceran 10^{-7} dan 10^{-8} . Setelah itu dituang dalam media MRSA dengan cara didekatkan pada bunsen agar tidak terjadi kontaminasi oleh bakteri yang tidak diinginkan. Selanjutnya ditutup cawan petri secara terbalik dan dilakukan penginkubasian selama 48 jam pada inkubator dengan suhu 32°C dan dihitung jumlah koloni yang tumbuh menggunakan koloni *counter* kemudian dihitung dengan rumus (Afzriansyah *et al.*, 2014):

$$\text{Jumlah sel Bakteri} = \text{Koloni} \times \frac{1}{\text{Faktor pengencer}} \times \frac{1}{\text{Volume}}$$

Hasil pengenceran jumlah koloni tidak boleh melebihi 300 (TBUD) kemudian diambil koloni yang paling banyak tumbuh dan dilakukan pemurnian untuk mendapatkan koloni tunggal (Sari *et al.*, 2013; Standen *et al.*, 2016). Isolasi dilakukan dengan memanaskan jarum 100se pada bunsen hingga berpijar, setelah itu diambil koloni bakteri dan kemudian ditanam pada MRSA dengan metode goresan kuadran hingga didapatkan koloni tunggal.

2. Uji Patogenitas

Uji patogenitas dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri kandidat hasil isolasi tersebut bersifat patogen terhadap ikan atau tidak. Uji ini dilakukan secara *in vitro* dengan menggunakan *blood agar sheep*. Uji patogenitas dilakukan dengan mengambil sebanyak satu ose bakteri pada koloni tunggal kemudian ditanam dengan metode goresan kuadran pada media *blood agar* dan diinkubasi selama 48 jam. Penentuan bakteri tersebut bersifat patogen atau tidak terlihat dari jenis haemolisin yang dikeluarkan (α , β dan γ).

3. Uji Antagonisme

Uji antagonisme dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri kandidat probiotik melawan bakteri patogen *Aeromonas hidrophyla* dan *Edwardsiella tarda*. Uji antagonisme dilakukan dengan mengambil isolat bakteri kandidat probiotik dan bakteri patogen yang selanjutnya masing-masing dimasukkan dalam tabung reaksi yang telah berisi sebanyak 10 ml TSB steril. Bakteri kandidat dan bakteri patogen di inkubasi selama 1 hari dalam suhu ruang setelah itu dilakukan pengenceran masing-masing dengan 10^{-8} . Kemudian bakteri patogen ditanam pada media MRSA dengan metode SWAP menggunakan *cotton bud* steril.

Bakteri kandidat ditanam pada kertas cakram steril dengan cara mengambil dan meletakkan kertas cakram pada media menggunakan pinset yang telah disterillkan, dan setelah itu diambil sebanyak 20 μL bakteri kandidat menggunakan mikropipet kemudian dituang tepat pada kertas cakram setelah itu diinkubasi pada incubator dengan suhu 32 °C selama 48 jam kemudian dilakukan pengamatan zona bening yang terbentuk dari penanaman kertas cakram dengan rumus Chandran *et al.* (2014), seperti di bawah ini.

Zona hambat (mm) = Diameter zona bening (mm) – Diameter cakram (mm)

4. Uji Pertumbuhan

Uji pertumbuhan dilakukan untuk mengetahui kemampuan tumbuh atau pertumbuhan maksimal dari bakteri kandidat probiotik jika dibandingkan dengan bakteri patogen. Uji pertumbuhan dilakukan dengan cara mengambil sebanyak satu ose bakteri kandidat kemudian ditanam pada media TSB, setelah itu dilakukan inkubasi pada suhu 32 °C selama 29 jam atau sampai didapat pertumbuhan maksimal dari bakteri uji. Pengujian dilakukan dengan mengambil sebanyak 3 ml pada setiap 5 jam pertama waktu inkubasi dan selanjutnya dilakukan setiap 2 jam pengamatan. Pengambilan dilakukan dengan mikropipet steril kemudian dilakukan perhitungan kerapatan dengan metode *Optical density* (OD) menggunakan panjang gelombang 600 nm. Selain dilakukan perhitungan dengan OD Penentuan laju pertumbuhan bakteri dilakukan dengan metode hitung cawan. Stok kultur 24 jam diambil setiap dua jam dengan menggunakan mikropipet sebanyak 1 mL kemudian dituang dalam media MRSA kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam hingga 48 jam. Selanjutnya dilakukan perhitungan dengan rumus:

$$PM = \frac{K}{A \times B \times C}$$

Dimana : PM = populasi mikroba (cfu/mL)

K = Jumlah koloni

A = volume inokulasi dalam media pengencer

B = Pada pengenceran berapa koloni dihitung

C = volume inokulasi dari media pengencer ke media padat (mL)

Peningkatan kepadatan sel bakteri terjadi karena kemampuan mikroba membelah menjadi 2 sel dalam setiap satuan waktu tertentu yang disebut dengan waktu generasi yang dapat dihitung dengan rumus berikut ini.

$$k = \frac{\log X_1 - \log X_0}{0,301 \cdot t}$$

Dimana : k = Konstanta kecepatan pertumbuhan (jumlah generasi/waktu)

K = Jumlah sel awal

A = Jumlah sel setelah waktu t

B = Waktu $x_1 - x_0$

1/k = Waktu generasi

5. Uji Enzim ekstraselluler

Hasil uji antagonisme dan karakter pertumbuhan kandidat probiotik terbaik

dilakukan uji ekstrasellular enzim agar diketahui enzim yang dihasilkan oleh bakteri

tersebut. Uji enzim ekstraseluler dilakukan secara *in vitro* dengan mengambil satu

ose bakteri kandidat kemudian ditamkan pada media TSB dan diinkubasi pada suhu

32 °C selama 24 jam dan kemudian dilakukan pengenceran hingga 10^{-8} kemudian

ditanam pada media yang sudah direkayasa nutrisinya.

a. Uji Enzim Ekstraselluler Amilase

Uji bakteri amilase dilakukan dengan menggunakan media PCA (*Plate Count*

Agar) yang telah diberi pati sebesar 1% dari volume media tanam. Selanjutnya di

lakukan sterilisasi dengan suhu 121 °C tekanan 1 atm, selama 15 menit. Setelah

dilakukan sterilisasi kemudian dituang media kedalam cawan petri dengan volume

15 ml, selanjutnya ditunggu dingin. Dimasukkan kertas cakram steril secara hati-hati

pada media yang telah jadi (mengeras). Setelah itu dimasukkan (dituang) sebanyak

20 μ L isolat uji dengan mikropipet steril. Dilakukan inkubasi pada suhu 32 °C selama

48 jam. Kemudian ditetesi iodine pada kertas cakram yang telah berisi isolat bakteri

dan didiamkan 15-30 menit yang selanjutnya dilakukan pengukuran diameter zona

bening (terbentuknya zona bening menunjukkan isolat bakteri mampu menghasilkan

enzim amilase). Diameter zona bening diukur menggunakan jangka sorong elektrik

dan kemudian dihitung zona hidrolisis (unit yang terdegradasi) dengan rumus sebagai berikut.

$$\text{Zona hidrolisis (mm)} = \text{Diameter zona bening (mm)} - \text{Diameter cakram (mm)}$$

b. Uji Enzim Ekrtaselluler Lipase

Uji bakteri lipolitik dilakukan dengan menggunakan media NA (*Nutrient Agar*) yang ditambah dengan 1% minyak ikan dari volume media tanam. Selanjutnya dilakukan sterilisasi dengan suhu 115 °C tekanan 1 atm, selama 15 menit agar minyak ikan tidak mengalami denaturasi. Setelah dilakukan sterilisasi kemudian dituang media kedalam cawan petri dengan volume 15 ml, selanjutnya ditunggu dingin. Setelah itu dimasukkan kertas cakram steril secara hati-hati pada media yang telah jadi (mengeras). Kemudian dimasukkan (dituang) sebanyak 20 µL isolat uji dengan mikropipet steril pada kertas cakram. Dilakukan inkubasi pada suhu 32 °C selama 48 jam. Kemudian kertas cakram yang telah berisi isolat bakteri ditetesи neutral red dan didiamkan 15-30 menit yang selanjutnya dilakukan pengukuran diameter zona bening (terbentuknya zona bening menunjukkan isolat bakteri mampu menghasilkan enzim Lipase). Diameter zona bening diukur menggunakan jangka sorong elektrik dan kemudian dihitung zona hidrolisis (unit yang terdegradasi) dengan rumus sebagai berikut.

$$\text{Zona hidrolisis (mm)} = \text{Diameter zona bening (mm)} - \text{Diameter cakram (mm)}$$

c. Uji Enzim Ektaselluler Protease

Uji bakteri proteolitik dilakukan dengan menggunakan media BA (*Bacto Agar*) yang ditambah dengan 10% casein dari volume media tanam. Selanjutnya dilakukan sterilisasi dengan suhu 105 °C tekanan 0,5 atm, selama 10 menit agar tidak terjadi denaturasi protein. Setelah dilakukan sterilisasi kemudian dituang media

kedalam cawan petri dengan volume 15 ml, selanjutnya ditunggu dingin. Kemudian dimasukkan kertas cakram steril secara hati-hati pada media yang telah jadi (mengeras). Dimasukkan (dituang) sebanyak 20 μ L isolat uji dengan mikropipet steril. Dilakukan inkubasi pada suhu 32 °C selama 48 jam. Selanjutnya dilakukan pengukuran diameter zona bening (terbentuknya zona bening menunjukkan isolat bakteri mampu menghasilkan enzim proteolitik). Diameter zona bening diukur menggunakan jangka sorong elektrik dan kemudian dihitung zona hidrolisis (unit yang terdegradasi) dengan rumus sebagai berikut.

$$\text{Zona hidrolisis (mm)} = \frac{\text{Diameter zona bening (mm)}}{\text{Diameter cakram (mm)}}$$

6. Identifikasi Bakteri Kandidat (BK)

a. Identifikasi Gram

Identifikasi gram dilakukan untuk mengetahui bakteri tersebut bersifat gram negatif atau positif selain itu kita mendapatkan bentuk sel. Uji dilakukan dengan cara mengambil sebanyak satu ose kemudian digoreskan pada objek glass, kemudian difiksasi hingga bakteri benar-benar melekat pada objek glass. Hasil fiksasi kemudian ditetesi dengan larutan kristal violet dan didiamkan selama 1 menit setelah itu dibilas dengan air mengalir dan kemudian dikering anginkan. Preparat kemudian ditetesi lugol sebanyak 1 tetes dan didiamkan selama 1 menit, setelah itu dicuci dengan alkohol 95% hingga bersih, setelah itu dicuci dengan air mengalir. Preparat yang telah dicuci dan dikering anginkan kemudian ditetesi dengan safranin sebanyak 1 tetes, kemudian dicuci dan difiksasi setalah itu dilakukan pengamatan dibawah mikroskop.

Prerparat yang telah didapat dilakukan pengamatan dibawah miroskop dengan perbesaran 1000 X dengan tambahan minyak imersi sehingga terlihat jelas berbagai bentuk sel bakteri (coccus, atau bacil). Hasil sel berwarna ungu menunjukkan bahwa

bakteri termasuk gram positif dan jika sel menunjukkan hasil warna merah berarti bakteri termasuk gram negatif.

b. Uji Biokimia

Uji biokimia dilakukan untuk mengetahui sifat kimiawi dari bakteri. Uji biokimia meliputi uji TSIA, GAS, H_2S , Katalase, Oksidase dan Oksidatif atau fermentative (O/F).

c. Fermentasi Karbohidrat

Uji fermentasi karbohidrat dilakukan untuk mengetahui sifat bakteri terhadap macam-macam senyawa turunan karbohidrat. Senyawa turunan karbohidrat yang diuji meliputi: Glukosa, Laktosa, Sukrosa, Maltosa, Manitol, Dulosit, Inositol, Arabinosa, Raffinosa, Trehalosa, dan Xylosa.

d. Uji Biokimia Lain

Uji Biokimia lain dilakukan untuk mengetahui kepekaan isolat bakteri terhadap bahan kimia sintetis. Uji biokimia lain meliputi: Gelatin, Motility, Indol, Simons Citrate, Methyl Red dan Voges Proskauer (MRVP), Arginin Dihidrolase, Lysine Decarboxilase, Ornithin Decarboxylase, Phenilalanin Deaminase. Hasil uji kemudian dilakukan identifikasi dengan mencocokkan pada buku identifikasi Cowan And Steel's Manual For The Identification Of Medical Bacteria 3rd Edition (Cowan, 1985).

4.6.2 Pengkayaan BK Probiotik

Isolat bakteri *indigenous* murni yang telah didapat dan disimpan diambil, komposisi media dan suhu serta interval waktu pemindahan tetap dalam artian dapat menjaga kondisi lingkungan awal. Seperti halnya makhluk hidup yang lain bakteri membutuhkan nutrisi untuk tumbuh dan memiliki siklus hidup tersendiri, mulai dari masa adaptasi, fase pertumbuhan, fase stasioner, sampai akhirnya

mencapai tahap kematian. Penanaman bakteri pada media limbah cair tahu dilakukan dengan cara mensterilisasi limbah cair tahu pada autoclave agar tidak terjadi kontaminasi bakteri lain yang tidak diinginkan.

Limbah cair tahu memiliki C_{org} 0,16% dan N_{total} 0,02% (8:1). Kebutuhan C:N rasio pada beberapa jenis bakteri berbeda. C_{org} dan N_{total} digunakan sebagai sumber energi oleh bakteri beberapa referensi menyebut C:N rasio 10:1 $\mu\text{g atom/liter}$ memiliki pertumbuhan sel biomassa yang optimal, dengan perbandingan 100 mg/L C_{org} : 10 mg/L N (10:1) menghasilkan biomassa terbaik (Goldman *et al.*, 1987; Wang *et al.*, 2016; Hulsen *et al.*, 2016). Dari beberapa referensi tersebut maka dilakukan penyesuaian C:N rasio bakteri kultur sebesar 10:1 kemudian diamati pertumbuhannya. C:N rasio didapat dari menambahkan sejumlah karbon dalam media kultur (Yuniartik, 2015). Bakteri yang tumbuh tersebut dilakukan pengenceran hingga dosis yang sesuai.

4.6.3 Uji Viabilitas BK Probiotik pada Pakan

Uji viabilitas bakteri pada pakan dilakukan dengan menambahkan bakteri hasil pengkayaan pada media limbah cair tahu dengan dosis 10^6 , 10^7 , dan 10^8 cfu/ml/gr pakan dengan perlakuan lama masa penyimpanan 0 hari, 1 hari, dan 3 hari. Konsentrasi bakteri pada pakan selanjutnya diuji dengan menggunakan *total plate count* (TPC) yang kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 48 jam. Jumlah koloni yang tumbuh pada media dihitung dengan menggunakan *colony counter* (Del'Duca *et al.*, 2013).

4.6.4 Pemberian Dosis yang Diberikan Pada Pakan

Berdasarkan uji viabilitas maka didapatkan konsentrasi bakteri kandidat yang mampu tumbuh dan bertahan hingga tiga hari. Hasil tersebut dijadikan sebagai



perlakuan dosis pada uji *in vivo* pada ikan nila selama 30 hari massa pemeliharaan. Metode yang digunakan yaitu *poure* menggunakan mikropipet dengan masa simpan tiga hari sebelum diberikan pada ikan (Seok *et al.*, 2012).

4.6.5 Pengukuran Parameter Uji *in-vivo*

a. Kelulushidupan (*Survival Rate*)

Kelulushidupan ikan nila (*Oreochromis sp*) dihitung pada akhir penelitian. Kelulushidupan menunjukkan seberapa besar ikan dapat beradaptasi dari lingkungan dan pakan yang diberikan selama penelitian yang diukur dengan rumus seperti dibawah ini (Widanarni *et al.*, 2012).

$$SR = \frac{Nt}{N0} \times 100\%$$

Keterangan :

SR : Kelulushidupan (%)

Nt : Jumlah ikan nila (*Oreocromis sp*) yang hidup pada akhir penelitian (ekor).

No : Jumlah ikan nila (*Oreocromis sp*) pada awal penelitian (ekor).

b. Laju Pertumbuhan Spesifik (*Specific Growth Rate*)

Ikan nila pada awal pemeliharaan dilakukan pengukuran berat badan dengan menggunakan timbangan digital untuk mengetahui berat rata-rata ikan awal (W_0),

Setelah dilakukan percobaan pada hewan uji selama 10 hari dilakukan pengukuran berat sebagai sampling awal pertumbuhan untuk menyesuaikan pemberian pakan pada 10 hari selanjutnya. Pengukuran dilakukan seiap 10 hari sekali selama penelitian. Hasil pengukuran kemudian dicatat dan kemudian dilakukan perhitungan dengan rumus (Chandran *et al.*, 2014):

$$SGR = \frac{\ln W_t - \ln W_0}{t} \times 100\%$$

Keterangan:

SGR

InWt

InWO

t

= Laju pertumbuhan spesifik (%BB/hari)

= Berat ikan pada waktu t (gr)

= Berat ikan pada awal penelitian (gr)

= Lama penelitian (hari)

c. Konversi pakan (*Feed Conversion Ratio/FCR*)

FCR (*Feed Conversion Ratio*) yaitu perbandingan (rasio) antara berat pakan

yang telah diberikan dalam satu siklus periode budidaya dengan berat total

(*biomassa*) yang dihasilkan pada saat itu (Widanarni *et al.*, 2012). Sampling

pertumbuhan dilakukan setiap 10 hari yang berguna untuk menyesuaikan jumlah

pakan yang diberikan. Sehingga apabila mengalami perubahan akan segera

diketahui dan dilakukan penyesuaian dengan kebutuhan ikan nila (*Oreochromis sp.*).

$$FCR = \frac{\Sigma F}{Wt - W0}$$

Keterangan:

FCR

ΣF

Wt

W0

= rasio konversi pakan (gr/gr)

= Jumlah pakan yang diberikan selama pemeliharaan (gr)

= Berat akhir ikan (gr)

= Berat awal penelitian (gr)

d. Efisiensi pakan (*Feed Efficiency/FE*)

Efisiensi pakan menunjukkan kualitas makanan yang diberikan selama

pemeliharaan sehingga kita dapat mengetahui seberapa besar pengaruh pakan

terhadap pertumbuhan. Efisiensi pakan dapat dihitung dengan rumus dibawah ini

(Afriansyah *et al.*, 2014):

$$EP = \frac{Wt - W0}{\Sigma F} \times 100\%$$

Keterangan:

EP

ΣF

= Efisiensi pakan (%)

= Jumlah pakan yang diberikan (gr)

e. Rasio Efisiensi Protein dan Retensi Protein

Pengukuran Efisiensi protein dan retensi protein dilakukan dengan menimbang berat awal dan berat akhir ikan selama pemeliharaan dengan jumlah protein yang dikonsumsi oleh ikan seperti rumus dibawah ini.

$$PER = \frac{W_t - W_0}{\Sigma Pkn \text{ (gr)} \times Pf (\%)} \times 100\%$$

Keterangan: PER = *Protein Efficiency Ratio*

W_0 = Berat rata-rata ikan pada awal pemeliharaan (gr)

W_t = Berat rata-rata ikan pada akhir pemeliharaan (gr)

ΣPkn = Jumlah pakan kering (gr)

Pf = Kadar protein dalam pakan (%)

Nilai retensi protein dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$RP = \frac{\Sigma Pt - \Sigma Po}{\Sigma PP} \times 100\%$$

Keterangan:

RP = Retensi Protein (%)

ΣPo = Jumlah Protein Tubuh Awal Ikan Nila (gram)

ΣPt = Jumlah Protein Tubuh Akhir Ikan Nila (gram)

ΣPP = Kadar protein pakan x jumlah pakan (gram)

f. Kelimpahan Bakteri Usus (KBU)

Uji KBU dilakukan dengan mengambil usus secara aseptis kemudian digerus dan setelah itu divortek. Pengenceran dilakukan sebanyak 10^{-10} untuk menghindari hasil TBUD sebagai asumsi bahwa jumlah bakteri mengalami peningkatan dibandingkan pada awal pemeliharaan. setelah itu ditanam tiga pengenceran



terakhir pada media MRSA dan diratakan menggunakan *three angel*. Selanjutnya dilakukan inkubasi dengan suhu 32 °C selama 48 jam, kemudian dihitung jumlah koloni menggunakan *colony counter* (Del'Duca *et al.*, 2013).

4.7 Analisa Data

Data yang telah diperoleh dari RAL (Rancangan Acak Lengkap) tersebut kemudian dianalisa secara statistik dengan melakukan uji normalitas dan menggunakan uji t test dengan SPSS 16.

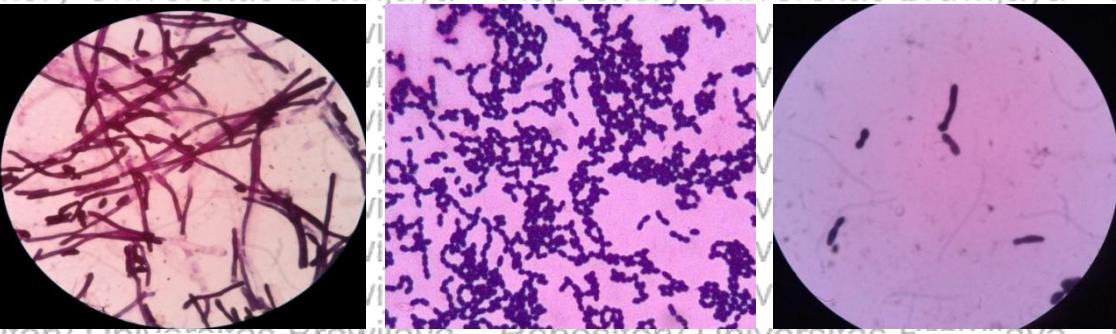
5.1 Karakterisasi Kandidat Probiotik

5.1.1 Uji Morfologi

Uji morfologi bakteri digunakan untuk mengetahui jenis bakteri berdasarkan karakterisasi gram. Hasil penanaman dan skrining koloni pada tiga cawan petri didapatkan 14 koloni. 14 koloni dominan tersebut kemudian dilakukan uji morfologi

Tabel 7. Hasil morfologi isolat bakteri kandidat probiotik.

Nama Isolat	Bentuk Bakteri	Gram
NL 001	Streptobacill	+
NL 002	Coccus/ Streptobacill	+
NL 003	Streptococcus/ Diplococcus	+
NL 004	Streptobacill	+
NL 005	Streptobacill	+
NL 006	Streptobacill	+
NL 007	Diplobacill	+
NL 008	Streptobacill/ Diplobacill	+
NL 009	Streptobacill	+
NL 010	Diplobacill/ Streptobacill	+
NL 011	Streptobacill	+
NL 012	Streptobacill/ Diplobacill	+
NL 013	Streptobacill	+
NL 014	Streptococcus/ Diplobacill	+



Gambar 6. Morfologi pewarnaan bakteri: keterangan (a). isolat NL 004, (b) isolat NL 007, (c) isolat NL 013.

Hasil pewarnaan menunjukkan bahwa 14 isolat merupakan gram positif dengan karakteristik yang berbeda, yaitu streptobasil, diplobasil dan diplokokus. Takenaka *et al.* (2012), menjelaskan bahwa pewarnaan bakteri merupakan metode yang memungkinkan untuk memprediksi nilai gram bakteri, baik gram positif kokus (GPC), maupun gram negatif batang (GNRs). Reaksi dari pewarnaan gram oleh bakteri berbeda-beda yang dipengaruhi perbedaan dinding sel dan bagian-bagian dalam seperti aktivitas aminopeptidase, ukuran serta regulasi dari sintesis sitrat, namun satu bagian yang paling membedakan adalah lipopolisakarida yang mengelilingi dinding sel (Wiegel dan Quandt. 1982).

Pemilihan bakteri kandidat probiotik sebagian besar probiotik berasal dari golongan gram positif. Penggunaan gram positif sebagai probiotik dirasa lebih aman karena tidak memiliki lipopolisakarida yang bersifat toksik. Sedangkan penggunaan gram negatif sebagai probiotik dikawatirkan akan menyebabkan akuisisi gen virulensi secara horizontal dalam lingkungan air. Selain itu kolonisasi bakteri gram negatif akan meningkatkan kemampuan infeksi terhadap ikan seperti pada *Staphylococcus* sp. dan *Pseudomonas* sp. pada berbagai kasus infeksi. (Newaj-Fyzul *et al.*, 2014; Lloveras *et al.*, 2010). Bakteri gram negatif mempunyai dinding sel

yang digunakan untuk berinteraksi antar bakteri sehingga dapat bereplikasi sangat cepat dan banyak mengalami mutasi. Mekanisme bertahan hidup beberapa bakteri gram negatif bersifat patogen dan secara cepat menjadi dominan sehingga tingkat virulensnya meningkat (Klimentová 2015; Maaoui et al., 2016).

5.1.2 Uji Daya Patogenitas dan Antagonisme

Uji patogenitas digunakan untuk menentukan aktifitas haemolisis atau kemampuan dan sifat bakteri (patogen/apatogen) (Apun-Molina *et al.*, 2009). Antagonisme merupakan kemampuan melawan dari bakteri terhadap bakteri patogen. Bakteri antagonis digunakan sebagai penyeimbang dan kompetitor bakteri patogen atau menjadi agen *biocontrol* (Balcazar *et al.*, 2006; NavinChandran *et al.*, 2014). Uji patogenitas dan antagonisme merupakan metode sederhana untuk menentukan kandidat probiotik berdasarkan kemampuan haemolisis dan aktifitas proteolitik. Hasil uji patogenitas dan antagonism dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8. Hasil uji patogenitas dan antagonisme

Isolat	Haemolisin			Antagonisme (mm)	
	α	β	γ	<i>A. hydrophila</i>	<i>E. tarda</i>
NL 001	Nd	Nd	+	Nd	Nd
NL 002	Nd	Nd	+	Nd	Nd
NL 003	Nd	Nd	+	Nd	Nd
NL 004	Nd	Nd	+	15,75	16,98
NL 005	Nd	Nd	+	Nd	Nd
NL 006	Nd	Nd	+	Nd	Nd
NL 007	Nd	Nd	+	14,52	16,58
NL 008	Nd	Nd	+	Nd	Nd
NL 009	Nd	Nd	+	5,16	5,93
NL 010	Nd	Nd	+	Nd	Nd
NL 011	Nd	Nd	+	Nd	Nd
NL 012	Nd	Nd	+	Nd	Nd
NL 013	Nd	Nd	+	9,43	5,92
NL 014	Nd	Nd	+	Nd	Nd

Ket : Nd = No detected + = Detected

as Brawijaya

Aktifitas haemolisis dapat diketahui dari zona bening yang terdapat pada sekitar koloni bakteri. Hasil uji patogenitas pada Tabel 8 dari 14 isolat menunjukkan hasil bahwa negatif pada α , β haemolisis sedangkan positif pada γ haemolisis. α dan β haemolisis berpotensi untuk memproduksi toksin dan berbahaya bagi ikan karena dapat menghidrolisis eritrosit, sedangkan γ haemolisis tidak bersifat toksik pada ikan (Apun-Molina *et al.*, 2009). Chang *et al.* (2000), menyebut faktor yang menyebabkan bakteri bersifat patogen adalah enzim eksogen berupa enterotoxins, protease, dan hemagglutinin. α dan β haemolisis diproduksi oleh bakteri gram negatif seperti *Vibrio* sp, *Pseudoalteromonas* sp, *Microbacterium* sp, *Pseudomonas* sp, *Aeromonas* sp, *Edwardsiella* sp, *Marinomonas* sp, dan *Shewanella* sp. γ haemolisis diproduksi oleh *Bacillus* sp dan golongan bakteri asam laktat (Chang *et al.*, 2000; Erdoğrul dan Erbilir 2006; Apun-Molina *et al.*, 2009 Klinkenberg *et al.*, 2010).

Hasil uji aktifitas antagonis dari 14 isolat hanya terdapat 4 isolat yang memiliki daya antagonis dilihat dari zona bening pada sekitar koloni. Isolat NL 004 sebesar 15,75 mm dan 16,98 mm, NL 007 14,52 mm dan 16,58 mm, NL 009 sebesar 5,16 mm dan 5,93 mm, serta NLS 013 9,43 mm dan 5,92 mm. Nilai antagonisme yang didapatkan kemudian diambil 3 terbaik untuk dilanjutkan skrining pada tahap selanjutnya. Kualitas antagonis dapat dilihat dari kemampuan hambat berdasarkan diameter zona hambat 21-25 mm tinggi, 16-20 mm intermediet, 11-15 mm medium, dan 5-10 mm rendah (Andani *et al.*, 2012; Ferreira *et al.*, 2015). Dilihat dari diameter zona hambat, isolat NL 004 termasuk dalam kelas intermediet. Nilai antagonisme menunjukkan bahwa isolat mampu menjadi biokontrol penyakit, khususnya yang disebabkan oleh bakteri *A. hydrophila* dan *E. tarda*.

Etymez dan Balcazar (2016), menyebut aktifitas antagonis bakteri genus *Bacillus* mempunyai zona hambat berkisar 12-16 mm dengan *Streptococcus iniae* dan *E. piscicida*. Aktifitas antagonis merupakan seleksi yang penting dalam mencari kriteria probiotik dan 80% berasal dari gram positif (Klinkenberg et al., 2010). Agen atau kandidat probiotik harus mampu melawan bakteri patogen. Isolat dipastikan dapat menghasilkan substansi daya hambat pada bakteri *A. hidrophyla* dan *E. tarda*. (Sun et al., 2010; Newaj-Fyzul et al., 2014).

Bakteri probiotik dapat mengeluarkan sitokins, bakteriosin dan memproduksi komponen-komponen volatil untuk merusak sifat viral patogen, menghasilkan hidrogen peroksida yang mampu meningkatkan aktifitas peroksidase, dan menghasilkan anti protease sehingga bakteri patogen tidak mampu tumbuh (Nayak 2010; Lazado dan Caipang 2014; Ferreira et al., 2015). Aktifitas antibakteri yang diproduksi oleh probiotik *Bacillus pumilus* atau *Bacillus clausii* pada kepadatan 10^6 cfu/gr dapat meningkatkan aktifitas lisozim, menghilangkan lendir dan plasma sel, menurunkan penyerapan dan pemanfaatan nutrisi oleh bakteri patogen selama 30 hari masa pemberian probiotik (Sun et al., 2010; Ramesh et al., 2015). Selain itu bakteri probiotik mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen, dan meningkatkan sistem pertahanan imun ikan (Nimrat et al., 2012).

5.1.3 Uji Pertumbuhan Bakteri

Karakterisasi pertumbuhan pertumbuhan bakteri kandidat probiotik dibandingkan dengan bakteri patogen. Isolat bakteri kandidat yang memiliki kemampuan tumbuh lebih baik merupakan indikasi adanya kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Uji dilakukan

bakteri dilakukan untuk mengetahui laju pertumbuhan bakteri patogen. Isolat pertumbuhan bakteri patogen. Uji dilakukan

selama 29 jam yang diinkubasi pada suhu 35 °C dan diukur dengan sepektofotometer pada panjang gelombang 600 nm (Yuniarti *et al.*, 2013).

Perbedaan karakter pertumbuhan menunjukkan bahwa kemampuan dalam memanfaatkan nutrisi dan berpoliferasi berbeda pada tiap isolat bakteri.

Perbandingan karakterisasi pertumbuhan bakteri kandidat probiotik dan bakteri patogen selama 29 jam masa inkubasi dalam media TSB dapat dilihat pada Tabel 9.

Tabel 9. Hasil karakterisasi pertumbuhan bakteri selama 29 jam.

Karakter Uji	Nama Isolat Bakteri		
NL 004	NL 007	A. <i>hydropila</i>	E. <i>tarda</i>
Laju Pertumbuhan spesifik (generasi/jam)	0,897	0,5237	0,629
Fase lag (jam)	³ 0,768	1	1
Waktu Generasi (jam)	1,317	1,09	2,731
			2,13

Isolat NL 004 memiliki laju pertumbuhan spesifik terbaik sebesar 0,897 generasi/jam. Kecepatan waktu membelah dan fase lag pada periode kultur bakteri dapat digunakan sebagai pertimbangan, karena salah satu syarat probiotik adalah mempunyai aktifitas dan laju pertumbuhan yang baik. Laju pertumbuhan atau proses membelah harus lebih cepat dibanding dengan laju perlawanan atau laju pertumbuhan bakteri patogen. Menurut Zheng *et al.* (2012), laju pertumbuhan bakteri kandidat probiotik akan menentukan kualitas dalam melawan bakteri patogen dalam medium cair. Bakteri kandidat probiotik juga harus mampu berpoliferasi dengan bakteri yang ada di dalam usus, selain itu harus dapat dikultur secara masal. (Egwatu *et al.*, 2014; Nayak, 2010; Newaj-Fyzul *et al.*, 2014).

NL 004 merupakan isolat terbaik dilihat dari waktu generasinya 0,768 jam dan lebih baik dari 2 bakteri patogen A. *hydropila* 2,731 jam serta E. *tarda* 2,13 jam.

Waktu generasi menunjukkan kecepatan bakteri dalam membelah menjadi dua.

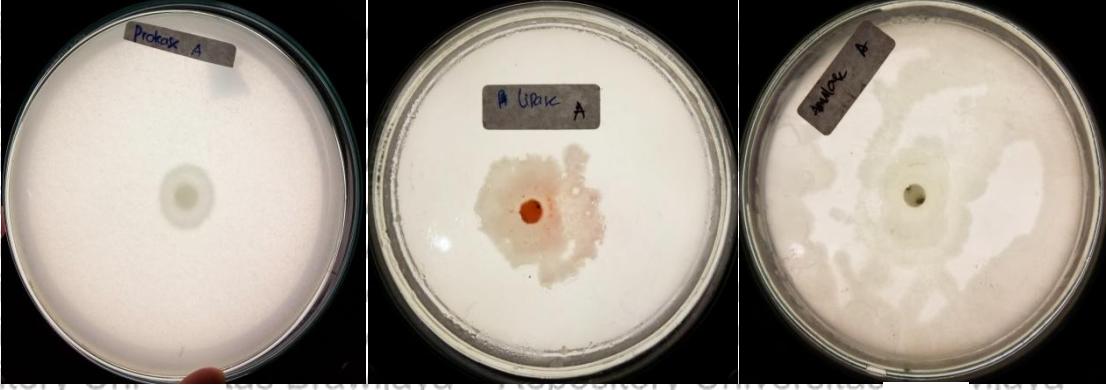
Waktu generasi yang cepat menunjukkan bahwa kemampuan bermultiplikasi sangat baik. Hal ini berarti isolat bakteri kandidat mampu bersaing dengan bakteri patogen.

Maier (2009), menjelaskan pertumbuhan bakteri merupakan bertambahnya biomassa sel bukan berdasarkan ukuran sel, meskipun rata-rata ukuran sel yang lebih besar akan mempengaruhi siklus pertumbuhan (Monod, 1949). Ferreira *et al.* (2015), menjelaskan kemampuan bakteri probiotik *Bacillus* spp. dalam bergenerasi akan menurunkan jumlah bakteri patogen dalam akuarium.

Fase lag merupakan fase adaptasi bakteri di mana isolat NL 004 memiliki waktu yang lebih lambat 3 jam. Kemampuan adaptasi isolat NL004 lebih lambat, hal ini disebabkan karena kesesuaian media pada beberapa bakteri berbeda. Namun pada akhir inkubasi memiliki biomassa bakteri tetinggi. Hal ini disebabkan oleh substansi yang dimiliki bakteri menjadi salah satu faktor pertumbuhan dan kebutuhan nutrisi bakteri pada setiap spesies berbeda sehingga terjadi perbedaan pertumbuhan (Touratieri dan Vezina 1999; Stabili *et al.*, 2010). Variasi densitas pada bakteri dipengaruhi oleh proses biokimia bakteri, metabolisme dan nutrisi (Monod, 1949).

5.1.4 Uji Enzim Ekstraselluler

Karakterisasi enzim ekstraselluler diperlukan untuk mengetahui jenis enzim yang dihasilkan oleh isolat bakteri. Bakteri menghasilkan enzim ekstraselluler dengan berbagai mekanisme kimia (Pokhrel *et al.*, 2014). Karakterisasi enzim yang diuji meliputi protease, lipase dan amilase karena beberapa bakteri berpartisipasi dalam menghasilkan enzim ekstraselluler tersebut (Balcazar *et al.*, 2006). Enzim ekstraselluler bakteri akan dikeluarkan atau dihasilkan ketika cadangan makanan



Gambar 7: Karakterisasi ekstraselluler enzim isolat NL 004: keterangan (a) uji enzim protease, (b) uji enzim lipase, (c) uji enzim amilase.

Uji enzim ekstraselluler dari bakteri berfungsi untuk mengetahui enzim yang dihasilkan bakteri saat ditambahkan dalam pakan maupun ketika hidup dalam sistem pencernaan (Nayak, 2010). Nilai kemampuan bakteri dapat menghidrolisis protein, lemak dan karbohidrat secara lengkap ditunjukkan pada Tabel 10 dan pada Lampiran 15. Kemampuan hidrolisis protein ditunjukkan dari zona bening sekitar koloni pada media yang diperkaya kasein, Hidrolisis lemak diketahui dari zona bening disekitar koloni pada media yang diperkaya minyak ikan, sedangkan hidrolisis karbohidrat ditunjukkan adanya zona bening disekitar koloni pada media yang diperkaya pati.

Tabel 10. Hasil uji ekstraselluler enzim bakteri kandidat probiotik

Nama Isolat	Diameter zona bening (mm)		
	Proteolitik	Lipolitik	Amilolitik
NL 004	$12,48 \pm 0,67$	$5,75 \pm 0,146$	$5,37 \pm 0,026$
NL 007	$11,08 \pm 0,04$	$4,303 \pm 0,05$	$5,27 \pm 0,020$
NL 013	$11,53 \pm 0,06$	$3,78 \pm 0,166$	$4,35 \pm 0,045$

Kemampuan hidrolisis protein terbaik didapatkan pada isolat NL 004 sebesar $12,48 \pm 0,67$ mm. Enzim proteolitik merupakan katalisator dalam hidrolisis dan

mampu memecah ikatan peptida atau polypeptida menjadi asam amino. Golongan bakteri *Bacillus* sp. dilaporkan dapat menghasilkan protease (Alemu, 2015).

Suplementasi *Bacillus* sp. secara nyata meningkatkan jumlah protease dalam tubuh udang sebesar 60% (Ziaei-Nejad et al., 2005).

Aktivitas protease oleh bakteri probiotik akan mampu meningkatkan produksi enzim protease dalam tubuh sehingga penyerapan nutrisi menjadi meningkat. Tidak hanya itu mereka juga sebagai fasilitator dalam pembentukan tulang dengan menghasilkan komponen-komponen mikro seperti kalsium, magnesium dan seng (Merrifield et al., 2010). Bakteri probiotik dapat meningkatkan plasma asam lemak dan kolestrol untuk meningkatkan produksi lemak dalam tubuh (Assem et al., 2014).

Hasil hidrolisis lemak terbaik berturut-turut didapatkan pada isolat NL 004 sebesar $5,75 \pm 0,146$ mm. Bakteri penghasil lipase memiliki struktur fleksibel dan bahan katalisator dalam menghidrolisis lemak. Aktifitas bakteri lipolitik akan meningkatkan daya cerna, penyerapan, penyusunan lemak, dan metabolisme lipoprotein (Sharma et al., 2001). Aktifitas lipase dapat ditingkatkan dengan suplementasi bakteri lipolitik seperti *Bacillus amyloliquefaciens*, *Pseudomonas* sp. dll (Zouaoui dan Abbouni et al., 2011; Selvamohan et al., 2012).

Hidrolisis pati (amilum) dihasilkan oleh bakteri penghasil enzim amilase. Nilai hidrolisis amilum terbaik didapatkan oleh isolat NL 004 sebesar $5,37 \pm 0,026$ mm. Hal ini menunjukkan bahwa isolat mampu memproduksi α -amilase yang memperpendek rantai oligosakarida pada rantai α -D-(1-4) glikosidik. Produk akhir α -amilase adalah panjang-pendeknya konfigurasi α .

Bakteri penghasil amilase diantaranya *Bacillus*

amyloliquefaciens dan *Bacillus licheniformis* (Aiyer, 2005; de Souza dan Perola 2010).

Menurut Alemu (2015), enzim diproduksi oleh mikroorganisme untuk memanfaatkan nutrisi dari media seperti karbon dan nitrogen. Dari ketiga jenis bakteri, bakteri penghasil protease dapat hidup dalam jangkauan lebih luas, yaitu mampu hidup dalam kondisi yang bervariasi seperti pH, suhu dan kuat dalam pengaruh ionik (Prabakaran *et al.*, 2015).

5.1.5 Identifikasi atau Uji Biokimia

Hasil uji skrining morfologi, patogenitas, antagonisme, karakter pertumbuhan dan ekstrasellular enzim, didapatkan bahwa Isolat NL 004 merupakan isolat dengan kemampuan nilai uji rata-rata terbaik. Selanjutnya dilakukan identifikasi secara biokimawi dengan tujuan untuk mengetahui jenis bakteri kandidat probiotik. Metode identifikasi yang digunakan meliputi uji biokimia dan fermentasi karbohidrat. Selain untuk mengetahui sifat kimia bakteri, uji biokimia juga mengetahui jenis enzim yang diproduksi oleh isolat bakteri kandidat. Uji biokimia merupakan uji kemampuan tertinggi bakteri secara spesifik (Badriyah *et al.*, 2015). Hasil identifikasi dapat dilihat pada Tabel 11 dan Lampiran 17.

Tabel 11. Hasil identifikasi morfologi, biokimia dan fermentasi karbohidrat

No	Jenis Pengujian	Nama Sampel Uji NL 004
1	Identifikasi Gram	
	Warna Koloni	Putih Susu
	Tepi Koloni	Berombak
	Jenis Gram	+
	Bentuk Bakteri	Bacil
2	Uji Biokimia	
	TSI Agar	A/A
	Gas	-
	H2S (asam belerang)	-
	Katalase	+
	Oksidase	+
	O/F	Fermentatif
3	Fermentasi Karbohidrat	
	Glukosa	+
	Laktosa	+
	Sukrosa	+
	Maltosa	+
	Manitol	+
	Dulcitol	-
	Salicin	+
	Inositol	-
	Sorbitol	+
	Arabinosa	+
	Raffinosa	-
	Trehalosa	+
	Xylosa	+
4	Uji Biokimia Lain	
	Gelatin	-
	Motility	+
	Indol	-
	Simmons Citrate	-
	Malonate	-
	Christensen's Urease	+
	Methil Red (MR)	+
	Voges Proskauer (VP)	+
	Arginin Dihidrolase	+
	Lysine Decarboxylase	-
	Ornithin Decarboxylase	-
	Phenylalanin Deaminase	-
	Aesculin Hydrolisis	+
5	Hasil Analisis	Bacillus sp

Ket: + = reaktif, - = non reaktif, A/A = Asam/Asam

Hasil uji biokimia dengan TSI Agar didapatkan A/A yang berarti bakteri menghasilkan asam. Bakteri tidak mengeluarkan gas, dan H₂S, bersifat katalase dan oksidase + yang berarti mampu sebagai katalisator dan bersifat aerob. Hasil uji O/F berwarna kuning yang berarti bersifat fermentatif.

Isolat bakteri bersifat motil, mampu mendegradasi urea, bersifat positif pada pereaksi MR dan VP, positif terhadap Arginin dan Aesculin. Uji Indol dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam memecah asam amino triptofan. Hasil indol + menunjukkan bahwa bakteri mampu menghasilkan enzim triptopanase.

Kemampuan bakteri dalam mereduksi gula karbohidrat dapat dilihat dari hasil + pada uji senyawa turunan karbohidrat seperti Glukosa, Maltosa, Laktosa, Sukrosa, Manitol, Sorbitol, Arabinosa dan Xylosa. Hal ini membuktikan bahwa bakteri memanfaatkan C sebagai sumber energi. Selain itu kemampuan bakteri dalam mereduksi urea menunjukkan bahwa bakteri mampu memanfaatkan N anorganik. C dan N digunakan bakteri untuk berkembang dan tumbuh (Hutabarat et al., 2013).

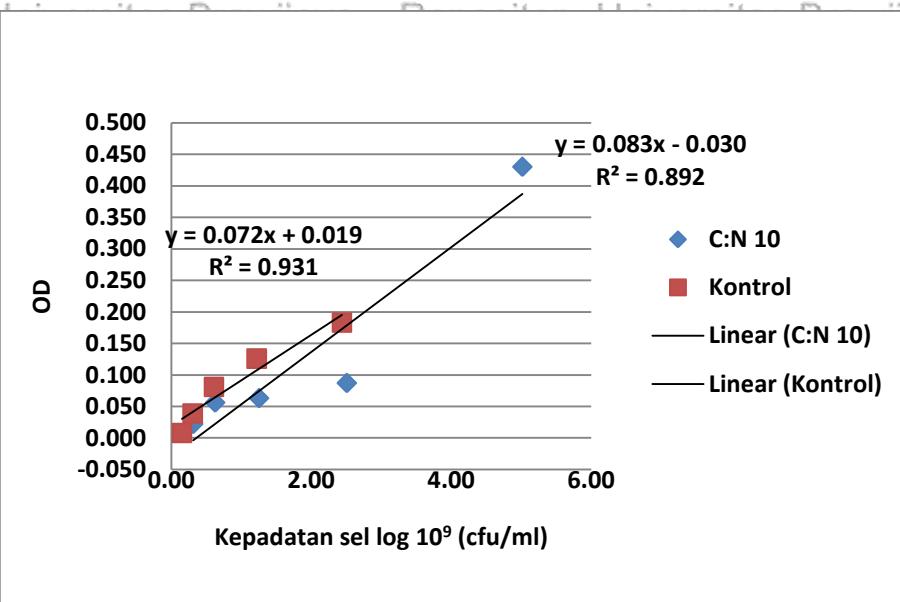
Isolat bersifat Katalase positif yang artinya bakteri mampu mengkatalisis penguraian hydrogen peroksida (H₂O₂) 3% menjadi air dan oksigen. Menurut Yulvizar (2013), hydrogen peroksida bersifat toksik terhadap sel bakteri patogen dan memonaktifkan enzim dalam sel.

Kunci identifikasi Cowan (1985), menjelaskan bahwa karakteristik bakteri gram + dengan endospora, dengan bentuk batang panjang (bacil) mampu menguraikan H₂O₂ 3%, termasuk ke dalam genus *Bacillus* dan *Clostridium*. Sedangkan jika berbentuk bulat maka (kokus) termasuk dalam genus *Micrococcus* dan *Staphylococcus* (Yusra et al., 2014). Menurut Holt et al. (1994), menjelaskan ciri-ciri dari genus *Bacillus* adalah bersifat motil, aerobik maupun fakultatif anaerob, bergerak dengan flagel peritrichous.

Hasil uji dan identifikasi yang dilakukan menunjukkan bahwa ciri-ciri bakteri dari genus *Bacillus*. Ciri-ciri genus bacillus adalah berbentuk basil, bentuk koloni sirkuler/bulat, berwarna putih susu, memiliki endospora, bersifat katalase positif, motilitas positif, uji indol negatif, uji ornitin negatif, dan uji sitrat negatif (Habiebi et al., 2014).

5.2 Pengkayaan pada Limbah Cair Tahu

Limbah cair tahu (LCT) merupakan salah satu limbah yang dapat dimanfaatkan sebagai media tumbuh bakteri probiotik. Hasil analisa LCT dalam satu liter memiliki kandungan C 0.16% : N 0.02% dengan rasio 8:1. Hasil karakter pengkayaan bakteri menggunakan limbah cair tahu dengan modifikasi C:N rasio 10 dapat dilihat pada Gambar 8 di bawah ini. Terjadi perbedaan karakter pertumbuhan antara kontrol dan C:N rasio 10. C:N rasio 10 memiliki laju pertumbuhan yang lebih baik dibandingkan C:N rasio kontrol.



Gambar 8. Karakter pertumbuhan kultur limbah cair tahu

Kandungan nutrisi pada media yang berbeda menyebabkan pertumbuhan bakteri berbeda. Bakteri membutuhkan nutrisi esensial seperti karbon dan nitrogen.

Kelimpahan karbon dan nitrogen dapat menjadi penyebab perbedaan pertumbuhan atau jumlah sel yang dihasilkan (Touratier dan Vezina 1999). Beberapa bakteri mampu untuk memanfaatkan nitrogen dalam bentuk organik maupun anorganik.

Kombinasi N organik dan anorganik akan menghasilkan biomassa yang optimal.

Aiyer (2005), menambahkan bahwa kekurangan N akan menurunkan produksi enzim. Nilai laju pertumbuhan dan fase lag dapat dilihat pada Tabel 12.

Tabel 12. Karakterisasi pertumbuhan bakteri kandidat isolat NL 004 pada LCT

Karakter Uji	Konsentrasi C:N rasio	
Kontrol (0)	10	
Laju Pertumbuhan Spesifik (Generasi/jam)	0,85	0,856
Fase lag (jam)	1	1
Waktu Generasi (Jam)	1,570	2,06

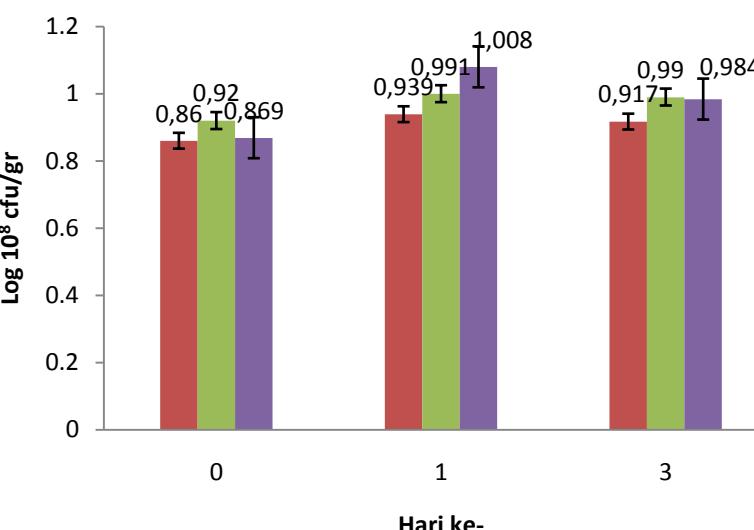
Hasil karakterisasi pertumbuhan bakteri menunjukkan bahwa laju pertumbuhan spesifik pada C:N 10 yaitu sebesar 0,856 generasi/jam dan pada kontrol sebesar 0,85 generasi/jam. C:N rasio memegang peranan dalam pembentukan tubuh, merupakan promotor pertumbuhan bakteri. Bakteri menggunakan nitrogen untuk memproduksi protein sellular. Bakteri aerobik akan mengalami pertumbuhan dengan mensintesis *polyhydroxybutyrat* (Vrede 1998; Hutabarat *et al.*, 2013).

Penambahan karbon organik akan menstimulasi pertumbuhan bakteri heterotrof, selain itu N anorganik juga diimmobilisasi dalam media (Widanarni *et al.*, 2010). Penggunaan C:N rasio yang optimal akan meningkatkan aktifitas enzimatis oleh

bakteri (Aiyer, 2004).

5.3 Uji Viabilitas Bakteri

Uji viabilitas bakteri dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri bertahan hidup dan mengetahui kepadatan mikroba dalam pakan. Viabilitas bakteri mempengaruhi keefektifan dosis yang diberikan, selain itu dapat diketahui apakah bakteri yang diberikan dalam kondisi aktif atau tidak aktif (Anurogo, 2014; Newaj-Fyzul *et al.*, 2014). Hasil uji viabilitas bakteri dapat dilihat pada Gambar 9. Bakteri dalam pakan menghidrolisis protein sebagai sumber N untuk bertahan hidup. Kandungan protein yang terhidrolisis ini akan meningkatkan kandungan vitamin dan asam amino (NavinChandran *et al.*, 2014).



Gambar 9. Viabilitas bakteri kandidat dalam pakan

Hasil uji viabilitas bakteri dalam pakan dengan kepadatan yang berbeda selama 3 hari masa inkubasi pada suhu 28°C didapatkan nilai yang berbeda. Nilai terendah pada perlakuan dosis 10^6 cfu/gr, kemudian 10^7 cfu/gr dan nilai tertinggi 10^8 cfu/gr pada hari pertama. Nilai viabilitas cenderung stabil pada dosis 10^7 cfu/gr. Nilai ini menjadi acuan dalam menentukan dosis probiotik untuk pakan yang diberikan

pada ikan nila selama 30 hari masa pemeliharaan dengan masa inkubasi yang terbaik (Román et al., 2012).

Nilai logaritma viabilitas terbaik pada hari ke-0 didapatkan pada dosis kepadatan 10^7 cfu/gr sebesar $0,92 \log_{10}^{10}$ cfu/gr. Viabilitas tertinggi pada hari ke-1 didapatkan pada dosis 10^8 cfu/gr sebesar $1,008 \log_{10}^{10}$ cfu/gr. Nilai viabilitas terbaik pada hari ke-3 didapatkan pada dosis 10^7 cfu/gr dengan kepadatan $0,99 \log_{10}^{10}$ cfu/gr. Hasil nilai viabilitas yang didapatkan merupakan indikator kecepatan berpoliferasi dan beradaptasi bakteri pada pakan sehingga untuk perlakuan uji *in-vivo* menggunakan dosis 10^7 cfu/gr dengan masa inkubasi 3 hari. Anurogo (2014), menjelaskan salah satu ciri probiotik yang baik yaitu mampu bertahan hidup di dalam bahan makanan dan mampu bermultiplikasi dengan cepat, baik dengan koloniasi temporer maupun permanen. Viabilitas menunjukkan tingginya survivabilitas bakteri sehingga memungkinkan untuk dikemas (Ramesh et al., 2015).

Uji viabilitas menjadi faktor keberhasilan suplementasi probiotik. Oleh karena itu perlu dilakukan monitoring sebelum dan sesudah pemberian probiotik (Del'Duca et al., 2013). Semakin tinggi nilai viabilitas menunjukkan semakin baik kemampuan bakteri dalam memanfaatkan nutrisi, memproduksi enzim, dan resisten terhadap faktor eksternal (Terzic-Vidojevic et al., 2015).

5.4 Aplikasi Bakteri Kandidat Probiotik (Uji *in-vivo*)

Pengaruh pemberian kandidat probiotik dengan kepadatan 10^7 cfu/gr terhadap pertumbuhan ikan selama 30 hari didapatkan nilai rata-rata ($\pm SD$) pada setiap parameter utama Kelulushidupan/Survival Rate (SR), Laju Pertumbuhan Spesifik/Spesific Growth Rate (SGR), Konversi pakan/Feed Conversion Ratio (FCR), Efisiensi Pakan/Feed Efficiency (FE), Rasio efisiensi protein/Protein Efficiency Ratio

Tabel 13. Hasil uji parameter utama penelitian dengan *t independent test* SPSS 16.

Parameter Utama	Perlakuan
SR (%)	Kontrol 10^7 CfU/gr
SGR (%BB/hari)	Probiotik 10^7 CfU/gr
FCR	$96^a \pm 3,46$
FE (%)	$1,54^a \pm 0,08$
PER	$3,07^a \pm 0,114$
RP (%)	$32,65^a \pm 1,24$
Kelimpahan bakteri usus	$1,94^b \pm 0,037$
10^{11}(cfu/ml)	$51,9^b \pm 1,00$
	$1,07^a \pm 0,04$
	$14,17^a \pm 0,97$
	$1,70^b \pm 0,03$
	$20,92^b \pm 0,54$
	$14,404^a \pm 7,57$
	$46,273^b \pm 2,07$

Keterangan: notasi yang berbeda menunjukkan hasil uji beda nyata pada taraf sig<0,05.

5.4.1 Kelulushidupan/Survival Rate (SR)

Pemberian probiotik terhadap kelulushidupan ikan nila (*Oreocromis* sp) dengan kepadatan bakteri sebanyak 10^7 cfu/gr dilakukan selama 30 hari yang diberikan melalui pakan. Pakan diberikan dua kali dalam satu hari dengan feeding rate 5% dari biomass ikan. Hasil analisis uji t perhitungan dapat dilihat pada Lampiran 20.

Nilai kelulushidupan ikan kontrol sebesar 94,67% sedangkan pada perlakuan sebesar 96%. Hasil analisis uji t untuk kelulushidupan ikan nila selama pemeliharaan tidak berbeda dengan kontrol di mana $p>0,05$. Probiotik yang diberikan tidak berbahaya pada ikan sehingga nilai kelulushidupan sama baiknya. Kelulushidupan ikan tidak hanya dipengaruhi oleh kualitas pakan, akan tetapi faktor lingkungan juga saling mempengaruhi.

Protein pakan yang digunakan dalam penelitian ini sebesar 30,40 %, dengan kandungan protein tersebut menunjukkan bahwa ikan masih dapat hidup dalam kondisi normal. Beberapa referensi menunjukkan bahwa kebutuhan protein ikan nila yaitu 25%, 34%, hingga 45% (Pirarat *et al.*, 2011b; Telli *et al.*, 2014; Apún-Molina *et al.*, 2009). Apún-Molina *et al.* (2009), menambahkan kelulushidupan ikan nila dengan suplementasi bakteri asam laktat sebesar 93,2%. Bakteri probiotik dalam akuakultur akan menjaga dan meningkatkan kelulushidupan 90 hingga 98% (Ekasari *et al.*, 2015).

Kualitas air seperti oksigen, nitrat dan nitrit dapat mempengaruhi sistem kerja hormon yang berhubungan dengan homeostatis tubuh dan kelulushidupan ikan (Meinelt *et al.*, 2010). Kualitas air dalam penelitian ini dipengaruhi oleh sistem sirkulasi air yang digunakan yaitu dengan kecepatan air 100 ml/detik. Sistem sirkulasi air akan dapat mengontrol pengaruh pH dan saturasi oksigen (Treasurer, 2012).

5.4.2 Laju Pertumbuhan Spesifik/*Spesific Growth Rate (SGR)*

Pertumbuhan merupakan faktor utama dalam peningkatan produksi. Hasil analisis uji t mengenai pengaruh probiotik terhadap SGR dapat dilihat pada Lampiran 21. Nilai laju pertumbuhan spesifik pada kontrol sebesar 1,54 %BB/hari sedangkan pada perlakuan sebesar 2,44 %BB/hari. Hasil analisa laju pertumbuhan didapatkan hasil berbeda nyata $p<0,05$. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian probiotik NL 004 sebanyak 10^7 cfu/gr memberikan laju pertumbuhan yang lebih baik dibanding dengan kontrol yaitu meningkatkan laju pertumbuhan sebesar 63%.

Suplementasi probiotik dalam pakan dapat meningkatkan laju pertumbuhan ikan, karena terjadi penyerapan nutrisi yang lebih baik. Uji skrining didapatkan

bahwa isolat NL 004 mampu mendegradasi protein, lemak dan karbohidrat sehingga ketika isolat disuplementasi pada pakan terjadi peningkatan hidrolisis tiga komponen tersebut. Menurut Telli *et al.* (2014), probiotik dapat memodulasi pertumbuhan bakteri saluran pencernaan penghasil enzim pencernaan. Bakteri kandidat probiotik isolat NL 004 membantu menormalkan mikroflora dalam saluran pencernaan dan meningkatkan nutrisi dengan cara detoksifikasi komponen-komponen umum dalam pakan bersamaan dengan memecah komponen yang sulit dicerna dengan enzim hidrolitik seperti amilase dan protease serta memproduksi vitamin seperti biotin dan vitamin B12 (Pirarat *et al.*, 2011).

Pemberian probiotik pada pakan dapat merubah rasio bakteri yang terdapat pada saluran pencernaan. Peningkatan jumlah bakteri dapat meningkatkan produksi eksogenus enzim dan menstimulasi jumlah enzim *endogenous* yang berperan dalam penyerapan nutrisi (Mona *et al.*, 2015). Pemberian probiotik *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus ramnosus* GG dengan dosis 10^{10} cfu/gr pada ikan nila, memberikan hasil yang nyata terhadap pertumbuhan. Pemberian *Bacillus* sp pada ikan nila melalui pakan selama 6 minggu meningkatkan laju pertumbuhan sebesar 2% dibanding kontrol (Apún-Molina *et al.*, 2009; Pirarat *et al.*, 2011b; Telli *et al.*, 2014; Mona *et al.*, 2015).

5.4.3 Konversi Pakan

Kualitas pakan dapat ditentukan melalui perhitungan konversi pakan. Hasil analisis uji t mengenai pengaruh pemberian probiotik terhadap konversi pakan dapat dilihat pada Lampiran 22. Nilai konversi pakan diketahui dari pengukuran biomassa ikan dibagi jumlah pakan selama pemeliharaan. Nilai konversi pakan pada kontrol sebesar 3,07, sedangkan pada perlakuan sebesar 1,94. Analisa uji t menunjukkan

bawa hasil uji berbeda nyata $p<0,05$. Suplementasi probiotik pada pakan dapat menurunkan nilai FCR sebesar 1,13. Pemberian probiotik pada pakan dapat meningkatkan kualitas pakan sehingga menurunkan nilai konversi pakan. Hal ini menurut Bagheri *et al.* (2008), disebabkan karena probiotik mengeluarkan enzim eksogenus dalam skala yang luas yang dapat menyuplai enzim dalam saluran pencernaan dan pasti dapat meningkatkan pertumbuhan dan menurunkan konversi pakan.

Perbedaan nilai konversi pakan pada pemberian probiotik dapat disebabkan oleh kemampuan bakteri NL 004 dalam mendegradasi serat pada pakan. Serat tersebut merupakan salah satu komponen pelengkap dari aktivitas enzim endogenous dalam sistem pencernaan ikan (Adeoye *et al.*, 2016). Terán *et al.* (2015) dan Reda *et al.* (2016) menjelaskan bahwa bakteri probiotik dapat memproduksi asam lemak. Penggunaan bakteri asam laktat sebagai probiotik akan meningkatkan produksi asam lemak sebesar 16,30 %. Komponen asam organik yang dihasilkan oleh probiotik dapat menambah nilai dan meningkatkan kecernaan protein serta penyerapan mineral, sehingga nilai konversi pakan menjadi lebih baik. Hasil ini lebih baik jika dibandingkan dengan penggunaan prebiotik Astragalus polysaccharides yaitu menghasilkan FCR 2,34 (Zahran *et al.*, 2014).

5.4.4 Efisiensi Pakan

Efisiensi pakan merupakan indikator kesesuaian pakan yang diberikan. Hasil analisa uji t suplementasi probiotik berpengaruh nyata terhadap efisiensi pakan $p<0,05$ dapat dilihat pada Lampiran 23. Nilai efisiensi pakan menunjukkan prosentase pemanfaatan pakan untuk pertumbuhan. Efisiensi pakan mengalami peningkatan sebesar 19,25%. Nilai efisiensi pakan mengalami peningkatan karena

pakan yang disuplementasi probiotik lebih mudah diserap oleh ikan. Hal ini menurut Iwashita *et al.* (2015), dipengaruhi oleh kemampuan probiotik dalam memfasilitasi penyerapan pakan dan peningkatan nutrisi dalam pakan. Efisiensi pakan meningkat disebabkan karena kemampuan probiotik yang dapat meningkatkan jumlah bakteri di dalam saluran pencernaan, sehingga produksi enzim *eksogenous* meningkat (Cha *et al.*, 2013).

Peningkatan efisiensi pakan terjadi karena adanya peningkatan asam amino dalam proses inkubasi probiotik pada pakan selama tiga hari. Secara linier proses inkubasi dapat meningkatkan rasa dan bau dari pakan. Probiotik merupakan sumber vitamin, arabinosa, dan berbagai macam oligosakarida (Hassaan *et al.*, 2015). Pemberian probiotik *Bacillus subtilis* 10^8 cfu/gr dapat mendukung aktivitas protease yang akan meningkatkan pencernaan protein sehingga efisiensi pakan meningkat (Liu *et al.*, 2012).

5.4.5 Rasio Efisiensi Protein

Hasil analisa pengaruh pemberian probiotik terhadap rasio efisiensi protein dapat dilihat pada Lampiran 24. Nilai rasio efisiensi protein merupakan kemampuan ikan dalam memanfaatkan protein untuk pertumbuhan. Nilai rasio efisiensi protein pada kontrol sebesar 1,07 sedangkan pada perlakuan sebesar 1,70. Hasil analisa menunjukkan bahwa $p<0,05$ yang menunjukkan bahwa pemberian probiotik berpengaruh nyata terhadap REP.

Nilai rasio efisiensi protein mengalami peningkatan sebesar 62%. Peningkatan rasio efisiensi pakan merupakan indikasi bahwa telah terjadi penyerapan protein yang lebih baik. Pemberian probiotik dapat memfermentasi pakan (hidrolisis N) sehingga meningkatkan kadar protein, lemak dan kecernaan

energi. Hal ini dapat mengurangi penggunaan pakan sebesar 20% (Abu Elala dan Ragaa 2015).

Peningkatan bakteri dalam saluran cerna dapat melengkapi, merubah dan meningkatkan rasio kecernaan dan penyerapan pakan (Adeoye et al., 2016).

Suplementasi probiotik 10^8 - 10^{10} cfu/gr selama 60 hari dapat meningkatkan efisiensi protein dengan meningkatkan aktivitas enzim pencernaan. Peningkatan berkaitan dengan jenis probiotik, dosis, viabilitas, dan durasi dalam pemberian (Cha et al., 2013). Eksogenus enzim khususnya protein yang dikeluarkan oleh bakteri kandidat NL 004 meningkatkan PER. Hasil ini lebih baik jika dibandingkan penggunaan kombinasi eksogenus enzim dengan probiotik oleh Adeoye et al., (2016).

5.4.6 Retensi Protein

Retensi protein merupakan prosentase kemampuan ikan dalam memanfaatkan protein pada pakan untuk disimpan dalam tubuh. Hasil analisa yang menunjukkan bahwa pemberian probiotik memberikan pengaruh nyata terhadap RP $p<0,05$. Nilai retensi protein pada perlakuan sebesar 20,92% sedangkan pada kontrol sebesar 14,17%. Hasil penelitian Soedibya (2013), retensi protein ikan nila GIFT dengan suplementasi probiotik sebesar 16,48 %. Hal ini menunjukkan bahwa kandidat probiotik isolat NL 004 lebih baik daripada probiotik yang digunakan Soedibya (2013). Thorstad et al. (2013), menjelaskan bahwa peningkatan kemampuan retensi protein sejalan dengan meningkatnya jumlah protease pada tubuh ikan. Hal ini disebabkan oleh meningkatnya jumlah bakteri proteolitik dari suplementasi kandidat probiotik yaitu isolat NL 004 yang merupakan isolat dengan kemampuan proteolitik tertinggi dari proses skrining.

Retensi protein yang berbeda mengekspresikan bahwa pemberian probiotik meningkatkan kadar protein pakan, dari proses fermentasi (lama simpan) pakan. Menurut Soedibya (2013), bakteri probiotik genus *Bacillus* merupakan jenis bakteri proteolitik, asakarolitik (menguraikan disakarida atau polisakarida menjadi gula sederhana) dan pektinolitik (mampu menghasilkan pektin atau karbohidrat kompleks). Proteolitik disekresikan oleh bakteri probiotik sehingga dapat memutus ikatan rantai protein menjadi asam amino bebas yang lebih menguntungkan untuk ikan. *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus lactis* dan *Saccharomyces cerevisiae* yang disuplementasi pada pakan secara nyata dapat meningkatkan aktivitas protease pada saluran pencernaan ikan nila (Mohapatra et al., 2012).

5.5 Kelimpahan Bakteri Usus (KBU)

Evaluasi kelimpahan bakteri probiotik pada usus ikan digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri dapat menempel atau menempati ruang pada dinding usus (Selim dan Reda, 2015). Hasil analisis uji t mengenai pemberian probiotik terhadap kelimpahan bakteri pada usus dapat dilihat pada Lampiran 26.

Nilai kelimpahan bakteri pada saluran pencernaan mengalami peningkatan yaitu pada kontrol sebesar $14,404 \times 10^{11}$ cfu/ml, sedangkan pada perlakuan pemberian bakteri kandidat NL004 sebesar $46,273 \times 10^{11}$ cfu/ml, atau mengalami peningkatan sebesar $31,869 \times 10^{11}$ cfu/ml.

Hasil analisis uji t menunjukkan bahwa suplementasi kandidat probiotik mempengaruhi kelimpahan bakteri usus $p < 0,05$. Peningkatan kelimpahan bakteri usus disebabkan bakteri kandidat NL 004 yang mampu menempel dan memodulasi pertumbuhan bakteri saluran pencernaan. Hasil ini juga menunjukkan bahwa isolat NL 004 dapat dijadikan kandidat probiotik. Menurut Iwashita et al. (2015), salah satu

syarat probiotik adalah bakteri mampu hidup dan berkolonisasi pada dinding usus serta menstimulasi pertumbuhan bakteri baik dalam usus. Evaluasi peningkatan bakteri pada usus merupakan salah satu indikasi bahwa bakteri mampu melewati saluran pencernaan mampu mentolerir enzim *endogenous* dan mampu berasosiasi dengan bakteri dalam usus. Pemberian *Lactobacillus plantarum* mampu meningkatkan jumlah koloni dalam usus sebanyak 91-94 % selama 5 minggu masa pemberian (Cha *et al.*, 2013; Zahran *et al.*, 2014).

Bakteri probiotik secara nyata meningkatkan jumlah koloni dalam usus yang dapat meningkatkan respon imun sehingga meningkatkan kelulushidupan ikan (Liu *et al.*, 2012). Peningkatan bakteri probiotik pada usus akan meningkatkan laju penyerapan nutrien, peningkatan efisiensi pakan, memperbaiki konversi pakan dan akan meningkatkan pertumbuhan (Iwashita *et al.*, 2015; Hassaan *et al.*, 2015).

5.6 Parameter Penunjang

Pengaruh pemberian probiotik dengan kepadatan 10^7 cfu/gr terhadap parameter penunjang pada penelitian mengenai pH, suhu dan DO. Berdasarkan hasil penelitian didapatkan nilai rata-rata ($\pm SD$) pada setiap parameter penunjang kualitas air pH, suhu dan DO selama penelitian dapat dilihat pada Tabel 13.

Sedangkan untuk nilai normalitas data dapat dilihat pada Lampiran 27.

Tabel 14. Uji t parameter penunjang kualitas air selama penelitian

Parameter Penunjang	Perlakuan
pH	Kontrol $7,24^a \pm 0,248$ Probiotik 10^7 Cfugr $7,49^a \pm 0,13$
Suhu °C	$28,67^a \pm 0,287$ $28,33^a \pm 0,174$
DO ppm	$3,20^a \pm 0,078$ $3,10^b \pm 0,05$

Keterangan: notasi yang berbeda menunjukkan hasil uji beda nyata pada taraf 0,05

5.6.1 pH

pH dalam budidaya ikan merupakan penentu sistem kerja homeostatis tubuh

ikan. Hasil analisa pengaruh pemberian probiotik terhadap kualitas air pH selama 30

hari masa pemeliharaan dapat dilihat pada Lampiran 27. Suplementasi probiotik

pada pakan tidak berpengaruh terhadap terhadap pH dengan analisa uji t $p>0,05$.

pH dalam perairan selama pemeliharaan memiliki hasil rata-rata $7,24\pm0,248$ dan

$7,49\pm0,13$. Beberapa referensi Treasurer, (2012); Tahil dan Dy, (2016); Tran-Ngoc et

al., (2016) menyebutkan bahwa nilai pH untuk budidaya ikan nila berkisar anatra 6,4-

7,78. Hal ini menunjukkan bahwa nilai pH selama penelitian masih dalam standar

budidaya ikan nila.

5.6.2 Suhu $^{\circ}\text{C}$

Suhu media pemeliharaan memegang peranan yang sangat penting dalam

metabolisme tubuh. Hasil analisa pengaruh pemberian probiotik terhadap kualitas air

suhu selama 30 hari masa pemeliharaan dapat dilihat pada Lampiran 27.

Suplementasi probiotik pada pakan tidak berpengaruh terhadap suhu

dengan hasil analisa uji t $p>0,05$. Suhu dalam perairan selama pemeliharaan

memiliki rata-rata $28,67 \pm 0,287$ dan $28,33 \pm 0,174$. Beberapa referensi Dunham et

al., (2014); Ning et al., (2015); Tran-Ngoc et al., (2016) menyebutkan bahwa nilai

suhu untuk budidaya ikan nila berkisar anatra $18\text{-}35 ^{\circ}\text{C}$, sedangkan nilai suhu

optimal untuk pertumbuhan $26\text{-}28 ^{\circ}\text{C}$. Hal ini menunjukkan nilai suhu selama

penelitian masih dalam standar budidaya ikan nila.

5.6.3 DO

Oksigen merupakan salah satu faktor pembatas kehidupan ikan. Hasil

analisa uji t mengenai pengaruh suplementasi probiotik pada pakan terhadap

kualitas air DO dapat dilihat pada Lampiran 27. Suplementasi probiotik pada pakan berpengaruh terhadap terhadap DO media pemeliharaan ($p<0,05$). Hal ini disebabkan ikan yang disupplentasi probiotik akan mengalami metabolisme yang lebih tinggi sehingga meningkatkan tingkat konsumsi oksigen. Menurut Caamal-Monsreal *et al.* (2016), konsentrasi oksigen di dalam perairan digunakan oleh ikan untuk membakar nutrien dalam tubuh. Konsentrasi oksigen yang berubah secara drastis akan mempengaruhi suplai nutrisi ke berbagai jaringan tubuh DO dalam perairan selama pemeliharaan memiliki nilai rata-rata sebesar $3,20\pm0,078$ ppm dan $3,10\pm0,05$ ppm. Beberapa referensi, Dunham *et al.*, (2014); Ning *et al.*, (2015); Caamal-Monsreal *et al.*, (2016); Reda *et al.*, (2016) menyebutkan bahwa kadar DO untuk budidaya ikan berkisar antara 2-9 ppm, sedangkan nilai DO optimal untuk pertumbuhan sebesar 3,2-6,9 ppm. Hal ini berarti nilai DO selama penelitian masih dalam standar budidaya ikan nila.

6.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian upaya isolasi bakteri *indigenous* ikan nila (*Oreochromis sp*) yang diperkaya pada limbah cair tahu terhadap laju pertumbuhan spesifik sebagai berikut:

- Terdapat bakteri *indigenous* yang berpotensi sebagai kandidat probiotik dengan karakteristik yaitu gram +, *aphatogen* (*haemolisin γ*), kemampuan antagonis terhadap bakteri *Aeromonas hidrophyla* dan *Edwardsiella tarda* berturut-turut sebesar 15,75 mm dan 16,98 mm yang termasuk kelas *intermediet*. Mampu mengeluarkan enzim proteolitik sebesar 12,48 mm yang termasuk kelas *intermediet*, amilolitik sebesar 5,75 mm yang termasuk kelas rendah, dan lipolitik sebesar 5,37 mm yang termasuk kelas rendah. Mempunyai konstanta laju pertumbuhan yang lebih baik daripada bakteri patogen 0,897 generasi/jam, mampu hidup dalam pakan selama 3 hari, hasil uji biokimiawi menunjukkan bahwa isolat NL 004 adalah bakteri *Bacillus sp*.
- C:N rasio 10 yang ditambahkan pada limbah cair tahu dapat menghasilkan laju pertumbuhan spesifik 0,856 generasi/jam, sedangkan kontrol 0,85 generasi/jam.
- Suplementasi bakteri *indigenous* kandidat probiotik NL 004 sebanyak 10^7 cfu/gr secara nyata meningkatkan SGR 0,9 %BB/hari, menurunkan FCR 1,13, FE mengalami peningkatan sebesar 19,25%, PER meningkat 0,62, RP meningkat 6,75% dan kelimpahan mikroba pada usus meningkat $31,869 \times 10^{11}$ cfu/ml.

6. Kesimpulan dan Saran

Repository Universitas Brawijaya

6.2 Saran

Aplikasi probiotik sebaiknya dilakukan dengan menggunakan bakteri indigenous dengan kepadatan 10^7 cfu/gr, yang dilakukan inkubasi selama 1 atau 3 hari sebelum diberikan pada ikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abass, N.Y., H. E. Elwakil, A. A. Hemeida, N. R. Abdelsalam, Z. Ye, B. Su, A. S. Alsaqufi, Chia-ChenWeng, V. L. Trudeau, and R. A. Dunham. 2016. Genotype-environment interactions for survival at low and sub-zero temperatures at varying salinity for channel cat fish, hybrid cat fish and transgenic channel cat fish. *Aquaculture*. **458**: 140–148.
- Abd El-Rhman, A.M., Y.A.E. Khattaband and A.M.E.Shalaby.2009. *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish and Shellfish Immunology*. **27**: 175-180.
- Abdel-tawwab, M. Ahmad, Y. Khattab, and A.M.E.Shalaby.2010. Effect of dietary protein level, initial body weight, and their interaction on the growth, feed utilization, and physiological alterations of Nile tilapia, (*Oreochromis niloticus* L.). *Aquaculture*. **298** (3-4):267–274.
- Abu Elala, N.M. and N.M.Ragaa. 2015. Eubiotic effect of a dietary acidifier (potassium diformate) on the health status of cultured *Oreochromis niloticus*. *Journal of advanced research*. **6**(4):621–9.
- Adeoye, A.A.,Y. Rungtawan ,J. Alexander, R. Ana, D. L. Merrifield, and J.D.Simon. 2016. Combined effects of exogenous enzymes and probiotic on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth, intestinal morphology and microbiome. **463**: 61–70.
- Afriansyah, Saifullah, dan N.P.Achmad. 2014. Aplikasi probiotik untuk meningkatkan nilai kecernaan pakanikan nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal perikanan dan kelautan*.**4**: 235-242.
- Aiyer, P.V.D.2004. Effect of C : N ratio on alpha amylase production by *Bacillus licheniformis* SPT 27. *African Journal of Biotechnology*. **3**: 519–522.
- Akhter, N., B. Wu, M.M.Aamir and M.Muhammad. 2015. Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: A review. *Fish & Shellfish Immunology*. **45**: 733–741.
- Akshatha, K.N., S.M. Murthy, and N. Lakshmidevi. 2006. Purification And Characterization Of Lipase From Bacteria. *ABH/NAV*.**1**:19–27.
- Alemu, F. 2015. Isolation and screening of protease enzyme producing bacteria from cheese at Dilla University, Ethiopia.*International Journal of Nutrition and Food Sciences*. **4**:234–239.

- Repository Universitas Brawijaya
Alnahdi, H.S. 2012. Isolation and screening of extracellular proteases produced by new isolated *Bacillus* sp environmental samples and screened their capability of protease. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. **9**:71–74.
- Aly, M.M., T. Sanaa, M.A. Salel, and N. Lubna. 2012. Production of lipase from genetically improved *Streptomyces exfoliates* LP10 isolated from oil-contaminated soil. *African Journal of Microbiology Research*. **6**:1125-1137.
- Andani B.H.R.R, Tukmechi A, Meshkini S, and Sheikhzadeh N. Antagonistic activity of two potential probiotic bacteria from fish intestines and investigation of their effects on growth performance and immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Appl. Ichthyology*. 1–7.
- Anggraini, M. Sutisna, dan Y. Pratama. 2014. Pengolahan limbah cair tahu secara anaerob menggunakan sistem batch. *Jurnal Reka Lingkungan*. **1**:2.
- Anonimous. 2016. Rancangan Strategis Derektorat Jendral Perikanan Budidaya tahun 2015-2019. Departemen Kelautan dan Perikanan (DKP).
- Anurogo, D.2014. Probiotik: problematika dan progresivitasnya. *MEDICINUS*. **3**: 42-57.
- Apun-Molina, J.P., A. Santamarria-Miranda, Antonio,S. F. M. Diaz, and R. C. Maurilia 2009. Effect of potential probiotic bacteria on growth and survival of tilapia *Oreochromis niloticus* L., cultured in the laboratory under high density and suboptimum temperature. *Aquaculture Research*. **40**: 887-894.
- Aravindan, R., P. AnbumathiandT. Viruthagiri. 2007. Lipase applications in food industry. *Indian Journal of Biotechnology*. **6**:141–158.
- Ardita, N., B. Agung, dan L.A.S. Siti. 2015. Pertumbuhan dan rasio konversi pakan ikan nila (*Oreochromis niloticus*) dengan penambahan prebiotik. *Bioteknologi*.**12**:16-21.
- Arig, N.,S. Cüneyt, G. Alize, B.Fatih, Ç.Deniz, Y.Şükü, H. K. Okan, F. Kürsat, and S.Şahin. 2013. Effects of Probiotic (*Bacillus* sp.) Supplementation during Larval Development of Gilhead Sea Bream (*Sparus aurata*, L.). *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. **13**: 407-414.
- Aslamyah, S. 2006. Penggunaan Mikroflora Saluran Pencernaan Sebagai Probiotik Untuk Meningkatkan Pertumbuhan Dan Kelangsungan Hidup Ikan Bandeng (*Chanos chanos* Forsskal). *Disertasi.Sekolah pasca sarjana Institute Pertanian Bogor*.
- Assem, H., A.Khalifaand and M.ELSalhia. 2014. Physiological and microbiological indices as indicators of evaluating dietary fungi degraded date pits as a

- probiotic for cultured Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fingerling and its effect on fish welfare. *Egyptian Journal of Aquatic Research.* **40:**435-441.

Ausmus, S. 2010. Fish Feeds For Finding Alternative. Agriculture Research.

Austin, B. and P.A.W.Robertson.1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida**Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Journal of Fish Diseases.***18:**93-96.

Bagheri, T., A.H. Seyed, Y. Vahid, A. Morteza, and F. Ali.2008. Growth, survival : gut microbial load of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) fry given diet supplemented with probiotic during the two months of first feeding. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.* **8:** 43-48.

Balcazar, W., R. Johnma, R.Marcos, M.B. Maria, M. Alejandro, G. Wileidy, and A.Y.Luis. 2015. Bioprospecting glacial ice for plant growth promoting bacteria. *Microbiological Research.* **177:**1-7.

Basir, B. dan Surianti. 2013. Penggunaan prebiotik dan probiotik pada pakan buatan terhadap efisiensi pakan dan kualitas air media pemeliharaan udang vanamei (*Litopenaeus vannamei*). *Jurnal balik jiwa.* **4:**32-37.

Benedetti, S., E. S. Prudencio, C. M. O. Müller, S. Verruck, J. M. G. Mandarino, R. S. Leite, and J. C. C. Petrus. 2015. Antioxidant properties of tofu whey concentrate by freeze concentration and nanofiltration processes. *Journal Of Food Engineering.* **160:** 49-55.

Besson, M., M. Vandeputte, J.A.M. Van Arendonk, J. Aubin, I.J.M. de Boer, E. Quillet, and H. Komen. 2016. In fluence of water temperature on the economic value of growth rate in fi sh farming . The case of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) cage farming in the Mediterranean. *Aquaculture.* **462:** 47-55.

Buentello, J.A., D.M.G. Iii and W.H. Neill. 2000. Effects of water temperature and dissolved oxygen on daily feed consumption , feed utilization and growth of channel catfish (*Ictalurus punctatus*).*Aquaculture.* **182:** 339-352.

Buwono, I.D. 2000. Kebutuhan Asam Amino Esensial dalam Ransum Ikan.Kanisius: Yogyakarta. 56 hlm.

Caamal-monsreal, C., I. Uriarte, A. Farias, F. Díaz, A. Sánchez, D. Re, and C. Rosas. 2016. Effects of temperature on embryo development and metabolism of *O. maya*.*Aquaculture.***451:** 156-162.

Cha, J.H, S Rahimnejad, Si-Yong Y, Kang-Woong K, and K J Lee, 2013. Evaluations of *Bacillus* spp. As dietary additives on growth performance, innate immunity and disease resistance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) against *streptococcus iniae* and as water additives. *Aquaculture.* **402-403:** 50-57.

- Repository Universitas Brawijaya
Chang, C.W. and Liuand C.Shyu. 2000. Use of prawn blood agar hemolysis to screen for bacteria pathogenic to cultured tiger prawns *Penaeus monodon*. *Diseases Of Aquatic Organisms*. **43**: 153–157.
- Repository Universitas Brawijaya
Cheng, W. and C.Liu. 2004. Effect of dissolved oxygen on the acid – base balance and ion concentration of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Aquaculture*. **231**: 573–586.
- Cowan. 1985. *Cowan And Steel's Manual For The Identification Of Medical Bacteria 3rd Edition*. Cambridge University Press. United Kingdom.
- Repository Universitas Brawijaya
Dimitar, D., M. Bielecka, A. Troszyńska, S. Ziajka, and G. Lamparski. 2006. Sensory quality of new probiotic beverages based on cheese whey and soy preparation. *Juornal Of Food And Nutrition Sciences*. **1**: 71-77.
- Repository Universitas Brawijaya
De Silva, S.S and T.A. Anderson. 1995. Fish Nutrition in Aquaculture. Chapman and Hall: London. 319 pp.
- Repository Universitas Brawijaya
de Souza, P.M, and P. de Oliveira e Magalhaes. 2010. Application Of Microbial - Amylase In Industry – A Review. *Brazilian Journal of Microbiology*. **41**: 850–861.
- Repository Universitas Brawijaya
Dito, A. 2014. Probiotik: problematika dan progresivitasnya. *Medicinus*. **27**: 46-57.
- Repository Universitas Brawijaya
Dunham, R.A., A.C.R. Ramboux and D.A.Perera. 2014. Effect of strain on tolerance of low dissolved oxygen of channel X blue catfish hybrids. *Aquaculture*. **420–421**: 25–28.
- Repository Universitas Brawijaya
Dutta T.K, J. Malabendu, R. P. Priti, and B. Tanmay. 2006. The Effect of temperature , pH , and salt on amylase in *Heliodiaptomus viduus* (Gurney) (Crustacea : Copepoda: Calanoida). *Turk J. Zool*. **30**: 187–195.
- Repository Universitas Brawijaya
Egwatu T., O. Folasade, T. Ogunsola, I. M. Okodugha, B. Jide, D. G. Arewa, and O. A. Osinupebi. 2014. Effect of blood agar from different animal blood on growth rates and morphology of common pathogenic bacteria. *Advances in Microbiology*. **4**: 1237–1241.
- Repository Universitas Brawijaya
Erdoğrul Ö. And F. Erbilir. 2006. Isolation and characterization of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei* from various foods. *Turkish Journal of Biology*. **30**: 39-44.
- Repository Universitas Brawijaya
Etyemez, M. and B. Jose L. 2016. Isolation and characterization of bacteria with antibacterial properties from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Research in Veterinary Science*. **105**: 62-64.
- Repository Universitas Brawijaya
Felis, E. G. and F. Dellaglio. 2015. Taxonomy of *Lactobacilli* dan *Bifidobacteria*. *Curr.Issues Intestinal Microbial*. **8**: 44-61.

- Ferdous, Z., N. Nazmun, Md. Shafaet H., R. Kanij, and Md. M. Ali. 2014. Performance of different feeding frequency on growth indices and survival of monosex tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei : Cichlidae) Fry. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies.* **5:** 80–83.
- Fernando, J., D. R. Steven, D. W. Carl, C. Vaun, K. Yuka, R. Kenneth, L. Ann, R. G. Twibell, and N. M. Hyde. 2016. Optimizing fish meal-free commercial diets for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture.* **452:** 357–366.
- Ferreira, G.S., C. B. Norha, A. P. Scheila, G. Cristhiane, do Nascimento V. Felipe, L. P. M. José, and Q. S. Walter. 2015. Microbial biofloc as source of probiotic bacteria for the culture of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture.* **448:** 273–279.
- Fyzul A., Newaj, A.H. Al-Harbi, and B. Austin. Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. *Aquaculture.* **431:** 1–11.
- Geraylou, Z., S. Caroline, R. Eugene, M. L. De, M. C. Christophe, A.D. Jan, B. Johan, and O. Frans. 2013. Effects of dietary arabinoxylan-oligosaccharides (AXOS) and endogenous probiotics on the growth performance, non-specific immunity and gut microbiota of juvenile Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Fish and Shellfish Immunology.* **35:** 766-775.
- Ghazalah, A.A., H. M. Ali, E. A. Gehad, Y. A. Hammouda, and H. A. Abo-State. 2010. Effect of probiotics on performance and nutrients digestibility of Nile tilapia (*Oreochromisniloticus*) fed low protein diets. *National Sciences.* **8:** 46–53.
- Giri, S.S., V. Sukumaran, and M. Oviya. 2013. Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* VSG3 improves the growth, immunity, and disease resistance of tropical freshwater fish, *Labeo rohita*. *Fish and Shellfish Immunology.* **34:** 660–666.
- Goldman, J.C, D. A. Caron, and M. R. Dennett. 1987. Regulation of gross growth efficiency and ammonium regeneration in bacteria by substrate C: N ratio. *Limnol. Oceanogr.* **32(6):** 1239-1252
- Gomez-gil B, A. Roque, and J. F. Turnbull. 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture.* **191:** 259–270.
- Gupta, A., P. Gupta and A. Dhawan. 2014. Dietary supplementation of probiotics affects growth, immune response and disease resistance of *Cyprinuscarpio* fry. *Fish and Shellfish Immunology.* **41:** 113-119.
- Hai, N. V. 2015. Research findings from the use of probiotics in tilapia aquaculture: A review. *Fish and Shellfish Immunology.* **45:** 592-597.



- Han, B., Wei-qing Long, Ju-yun He, Young-jian Liu, Yu-qi Si, and Li-xia Tian. 2015. Effects of dietary *Bacilluslicheniformis* on growth performance, immunological parameters, intestinal morphology, and resistance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromisniloticus*) to challenge infections. *Fish and Shellfish Immunology.* **46:** 225-231.
- Handajani, H.; S. Dwi H dan Sujono. 2013. Penggunaan berbagai asam organik dan bakteri asam laktat terhadap nilai nutrisi limbah ikan. *Depik.* **2:** 126-132.
- Hassaan, M.S., M. A. Soltan, and M. M. R. Ghonemy.2014. Effect of synbiotics between *Bacilluslicheniformis* and yeast extract on growth, hematological and biochemical indices of the Nile tilapia (*Oreochromisniloticus*). *Egyptian Journal of Aquatic Research.* **40:** 199-208.
- Hegar, B. 2007. Mikroflora saluran cerna pada kesehatan anak. *Dexa Media.* **20:** 3-5.
- Heo Won-Seok, Y. Ri-Kim, Eun-Young kim, C. B. Sungchui, and In-Soo Kong. 2013. Effects of dietary probiotic, *Lactococcuslactis* sub sp. *lactis* I2, supplementation on the growth and immune response of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture.* **276:** 20-24.
- Hülsen, T., M. B. Edward, Y. Lu, P. Daniel, K. Jürg, and J. B. Damien.2016. Domestic wastewater treatment with purple phototrophic bacteria using a novel continuous photo anaerobic membrane bioreactor. *Water Research.* **100:** 486–495.
- Hutabarat, J., S. B. Prayitno, and Y. S. Darmanto. 2013. The effect of different c:n and c:p ratio of media on the content of polyhydroxybutyrate in biofloc. *Journal of Coastal Development.* **16:** 114–120.
- Ibrahem, M.D. 2013. Evolution of probiotics in aquatic world: Potential effects, the current status in Egypt and recent prospectives. *Journal of Advanced Research.* **6:** 765-791.
- Irianto, A., Hernayanti dan N. Iriyanti. 2006. Pengaruh suplementasi probiotik a3-51 terhadap derajat imunitas *oreocromis niloticus* didasarkan pada angka kuman pada ginjal setelah uji tantang dengan *Aeromonas hidrophyla* dan *Aeromonas Salmonicida achromogenes*. *Jurnal Perikanan.* **8:** 144-152.
- Ishibashi, N., T. Yaeshima andH. Hayasama.1997. Bifidobacteria: their significance in human intestinal health. *Mal Journal Nutrition.* **3:** 149-159.
- Iwashita, M.K.P, B.N. Ivan, S.T. Jeffery, W. Theresa, and Maria J.T.R Paiva. 2015. Dietary supplementation with *Bacillussubtilis*, *Saccharomycescerevisiae* and *Aspergillusoryzae* enhance immunity and disease resistance against *Aeromonashydrophila* and *Streptococcus iniae* infection in juvenile tilapia *Oreochromisniloticus*. *Fish and Shellfish Immunology.* **43:** 60-66.

- Jabeen, S., M. Salim, and P. Akhtar. 2004. Feed conversion ratio of major carp *Cirrhinus mrigala* fingerlings fed on cotton seed meal , fish meal and barley. *Pakistan Vet.Journal.* 24(1): 1–4.
- Jing-jing, Liu.,L. Xiao-ping, Ren, Zhao, Yuan, Wang , A. Z. M. Salem, and C. Zong-jun. 2015. The effects of fermentation and adsorption using lactic acid bacteria culture broth on the feed quality of rice straw. *Journal of Integrative Agriculture.* 14(3): 503-513.
- Judoamidjojo M.,A. Aziz D, dan E. Gumbira S. 1992. Teknologi Fermentasi, hal 9. CV Rajawali. Bogor. 333hal.
- Kapareiko D., J. L. Hyun, J. S. Eric, H. Ammar, and H. W. Gary. 2011. Isolation and evaluation of new probiotic bacteria for use in shellfish hatcheries : ii. effects of a *vibrio* sp. probiotic candidate upon survival of oyster larvae (*Crassostrea virginica*) in Pilot-Scale Trials. *Journal of Shellfish Research.*30: 617-625.
- Karnwal, A. dan V. Nigam. 2013. Production of amylase enzyme by isolated microorganisms and it ' s application. *Research Article Biological Sciences.* 3: 354-360.
- Kim, Mi-Sun and Doong-Yeol Lee. 2010. Fermentative hydrogen production from tofu-processing waste and anaerobic digester sludge using microbial consortium. *Bioresource Technology.* 101: 48-52.
- Klimentová, J.2015. Methods of isolation and purification of outer membrane vesicles from gram-negative bacteria. *Microbiological Research.*170: 1–9.
- Klinkenberg, G., J. Skjermo, I. M. Aasen, and O. Vadstein. 2010. Selection of candidate probiotics by two different screening strategies from Atlantic cod (*Gadus morhua* L) larvae. *Veterinary Microbiology.*144: 153–159.
- Krishnamoorthy, R., K. Kim, P. Subramanian, M. Senthilkumar, R. Anandham, and T. Sa. 2016. Arbuscular mycorrhizal fungi and associated bacteria isolated from salt-affected soil enhances the tolerance of maize to salinity in coastal reclamation soil. *Agriculture, Ecosystems and Environment.* 231: 233–239.
- Koch, J.F., D. R. Steven, D. W. Carl, C. Vaun, K. Yuka, R. T. Kenneth, L. G. Ann, G. T. Ronald, and M. H. Nathan. 2016. Optimizing fi sh meal-free commercial diets for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture.*452: 357–366.
- Krogdahl, Å, A. Sundby, and H. Holm. 2015. Characteristics of digestive processes in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Enzyme pH optima , chyme pH, and enzyme activities. *Aquaculture.*449: 27–36.
- Lestari N.W, B. Agung, dan P. Artin. 2016. Bakteri Heterotrof aerobic asal saluran pencernaan ikan sidat (*Anguilla bicolor bicolor*) dan potensinya sebagai probiotik. *Bioteknologi.*13 (1): 9-17.

- Liu, C.H., Chiu, Shi-Wei Wang and W. Cheng. 2012. Dietary administration of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, enhances the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish and Shellfish Immunology*.**33**: 699-706.
- Lloveras, J., Mohamed-Issam Shukr, C. Pinos, A. Lindoulsi, and P. Grima. 2010. Usefulness of sputum gram stain and culture for diagnosis of pneumonia in a geriatric institution. *Annual Proceeding (Scientific Papers)*.**16**: 20-22.
- Maaoui, H., R. Jijie, Guo-Hui Pan, D. Drider, D. Caly, J. Bouckaert, N. Dumitrascu, R. Chtourou, S. Szunerits, and R. Boukherrou, 2016. A 980 nm driven photothermal ablation of virulent and antibiotic resistant Gram-positive and Gram-negative bacteria strains using Prussian blue nanoparticles. *Journal of Colloid And Interface Science*. **480**: 63-68.
- Maftei, NM, R. Dinic Ă, and G. Bahrim. 2012. Functional characterisation of fermented beverage based on soymilk and sea buckthorn syrup. *Food Technology*.**36**: 81-96.
- Maier, R.M. 2009. Bacterial Growth. *Review of Basic Microbiological Concepts*. pp.37-54.
- Meinelt, T., H. Kroupova, A. Stüber, B. Rennert, A. Wienke, and C.E.W. Steinberg. 2010. Can dissolved aquatic humic substances reduce the toxicity of ammonia and nitrite in recirculating aquaculture systems. *Aquaculture*. **306**: 378-383.
- Manin, F.,E. Hendalia, dan D. Yusrizal. 2012. Potensi bakteri *Bacillus* dan *lactobacillus* sebagai probiotik untuk mengurangi pencemaran amonia pada kandang unggas potency of *Bacillus* and *Lactobacillus*bacteria as probiotik to reduce ammonia pollution in poultry house.*Jurnal Peternakan Indonesia*, **14**(2).
- Mattarelli, P.,B. Bruno, H. Walter, and H. H. Wilhelm. 2014. Appendix: Guidelines for characterizing LAB, *Bifidobacteria* and related genera for taxonomic purposes. *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*.First Edition.
- Mc Farland, L. V. 2007. Diarrhoea associated with antibiotic use evidence supports the use of probiotics, but effectiveness depends on the strain. *British Medical Journal*.**335**: 54-55.
- Merrifield, L. D., D. Arkadios, F. Andrew, J. D. Simon, T. M. B. Remi, B. Jarl, C. Mathieu, and R. Einar. 2010. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*.**302**:1-18.
- Mohapatra, S., T Chakraborty, A.K Prusty, P. Das, K. Paniprasad, and K.N Mohanta. 2012. Use of different microbial probiotics in the diet of rohu, *Labeo rohita* fingerlings: Effects on growth, nutrient digestibility and retention, digestive enzyme activities and intestinal microflora. *Aquaculture Nutrition*. **18**: 1-11.

- Mona, M.H., El-Sayed T. Rizk, W. M. Salama, and M. L. Younis. 2015. Efficacy of probiotics, prebiotics, and immunostimulant on growth performance and immunological parameters of *Procambarus clarkii* juveniles. *The Journal of Basic and Applied Zoology.* **69:** 17–25.
- Narbuko, C dan A. Achmadi. 2007. Metodologi penelitian. Bumi Aksara. Jakarta. 205 hlm.
- NavinChandran, M., L. Palanisamy, M. Subramanian, R. Ramasamy, P. Santhiyagu, I. Grasian, and P. Arunachalam. 2014. Influence of probiotic bacterium *Bacillus cereus* isolated from the gut of wild shrimp *Penaeus monodon* in turn as a potent growth promoter and immune enhancer in *P. monodon*. *Fish and Shellfish Immunology.* **36:** 38-45.
- Nayak, S.K. 2010. A fish perspective. *Fish and Shellfish Immunology.* **29:** 2–14.
- Newaj-Fyzul, A., A. H. Al-Harbi, and B. Austin. 2014. Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. *Aquaculture.* **43:** 1-11.
- Nimrat, S., S. Suksawat, T. Boonthai, and V. Vuthiphandchai. 2012. Potential *Bacillus* probiotics enhance bacterial numbers ,water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Veterinary Microbiology.* **159:** 443–450.
- Ning, J., Y. Chang, W. Liu, J. Song, W. Zhang, and J. D. Key. 2015. Stress responses to mild and acute temperature decrease for two strains of sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Aquaculture.* **448:** 552–563.
- Noerkhaerin, P. A. 2014. Aplikasi prebiotik untuk meningkatkan nilai kecernaan pakan ikan nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Perikanan dan Kelautan.* **4:** 235–242.
- Nursyirwani, W., Asmara, A.E.T.H. Wahyuni, dan Triyanto.2011. Isolasi Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) dan Potensinya Sebagai Antivibrio. *Ilmu Kelautan.* **16:** 70-77.
- Pandiyan, P., D. Balaraman, R. Thirunavukkarasu, E. G. J. George, S. Kumaran, M. Sakthivel, and S. Balamurugan. 2013. Probiotics in aquaculture. *Drug Invention Today.* **5:** 55–59.
- Panneerselvam, T., and S. Elavarasi. 2015. Isolation of - Amylase producing *Bacillus subtilis* from Soil. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences.* **4:** 543–552.
- Pirarat, N. K., Pinpimai, M. Endo, T. Katagiri, A. Ponpornpisit, N. Chansue, and M. Maita. 2011. Modulation of intestinal morphology and immunity in nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Research in Veterinary Science.* **91:** 92-97.

- Pokhrel B., P. Ankit, G. Seema, B. Govinda, K. Sunil, C. K. Ram, and T. M. Rubin . 2014. Screening and optimization of extra cellular protease from bacteria isolated from sewage. *Europan Journal of Biotechnology and Bioscience.* **2:** 46–49.
- Prabakaran V., P. A. Soma and B. Thayalin. 2015. Screening and production of protease enzyme from marine microorganism and its industrial application. *Journal of Biotechnology and Biochemistry* **1:** 33–41.
- Prasad, M.P. 2015. Studies on lipase enzyme production from bacillus subtilis under different culture conditions. *European Journal of Biotechnology and Bioscience.* **2:** 15–19.
- Purwanta W, dan M. Firdayanti. 2002. Pengaruh aplikasi mikroba probiotik pada kualitas kimiawi perairan tambak udang. *Jurnal Teknologi Lingkungan.* **3:** 61-65.
- Purwitasari, E., A. Pangastuti, dan R. Setyaningsih. 2004. Pengaruh media tumbuh terhadap kadar protein *saccharomyces cerevisiae* dalam pembuatan protein sel tunggal. *Biotehnologi.* **1:** 37-42.
- Qi, Z., Xiao-Hua Zhang, B. Nico, and B. Peter.2009. Probiotics in aquaculture of China — Current state , problems and prospect. *Aquaculture.* **290 (1-2)**.
- Ramos, J.M.A., J.F.M. Goncalves, S. Batista, B. Costas, M.A Pires, P. Rema, and R.O.A Ozorio. 2015. Growth, immune responses and intestinal morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) supplemented with commercial probiotics. *Fish and Shellfish Immunology.* **45:** 19-26
- Rao, M.B., A.M. Tanksale, M.S. Ghate and V.V. Deshpande. 1998. Molecular and Biotechnological Aspect of Microbial Proteases. *Journla Microbiology Mol. Biol. Rev.* **62(3)**.
- Reda., R.M., M. Rania, M.S. Khaled, and I.E. El-Araby. 2016. Effects of dietary acidifiers on growth, hematology, immune response and disease resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish and Shellfish Immunology.* **44:** 496-503.
- Rengpipat, S., and W. Phianphak.1998. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth,. *Aquaculture.* **167:** 301–313.
- Richana, N. 2002. Produksi dan prospek enzim xilanase dalam pengembangan bioindustri di indonesia. *BuletinAgrobio* **5(1):** 29–36.
- Rizqiaty, H., S.L.J. Betty, N. Novik and N. Caecilia. 2005. Ketahanan dan viabilitas *lactobacillus plantarum* yang dienkapsulasi dengan susu skim dan gum arab setelah pengeringan dan penyimpanan. *Animal Production.* **10:** 179-187.

- Román, L. F. R., L. Sorroza, D. Padilla, B. Acosta, V. Grasso, J. Bravo, and F. Acosta. 2012. The invitro effect of probiotic *Vagococcus fluvialis* on the innate immune parameters of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. *Fish and Shellfish Immunology*. 33: 1071–1075.
- Rupali, D. 2015. Screening and Isolation of protease producing bacteria from soil collected from different areas of burhanpur region (mp) India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 4: 597–606.
- Saanin, H. 1984. *Taksonomi dan Kunci Identifikasi Ikan*. Bina Cipta, Jakarta. 131 hal.
- Sahzadi, T., M. Salim, and K. Shahzad. 2006. Growth performance and feed conversion ratio (FCR) of hybrid fingerlings (*CatlaCatla X LabeoRohita*) Fed On Cottonseed Meal, Sunflower Meal And Bone Meal. *Pakistan Vet. J.* 26(4): 163–166.
- Selim, K.M. and R. M. Reda. 2015. Improvement of immunity and disease resistance in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, by dietary supplementation with *Bacillus amyloliquefaciens*. *Fish and Shellfish Immunology*. 44: 496–503.
- Selvamohan, T., V. Ramadas, and T. A. Sathya. 2012. Optimization of lipase enzyme activity produced by *bacillus amyloliquefaciens* isolated from rock lobster *Panlirus Homarus*. *International Journal of Modern Engineering Research*. 2: 6–9.
- Shukla, M., Y.K. Jha, and S. Admassu. 2013. Development of probiotic beverage from whey and pineapple juice. *Food Processing & Technology*. 4:206.
- Stabili, L., R. Schirosi, M. Licciano, E. Mola and A. Giangrande. 2010. Bioremediation of bacteria in aquaculture waste using the polychaete *Sabella spallanzanii*. *New Biotechnology*. 27: 774-781.
- Standen B.T., M.D Rawling, S.J. Davies, M. Castex, A. Foey, G. Gioacchini, O. Carnevali, and D.L. Merrifield. 2013. Probiotic *Pediococcus acidilactici* modulates both localised intestinal and peripheral immunity in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish and Shellfish Immunology*. 35: 1097-1104.
- Sun, Y., Hong-Ling Yang, Ru-Long Ma, and Wen-Yan Lin The. 2010. Probiotic applications of two dominant gut *Bacillus* strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus cooides*. *Fish and Shellfish Immunology*. 29: 803–809.
- Sunaryanto R., M. Efriadi, dan M. Bambang. 2014. Uji Kemampuan *Lactobacillus casei* Sebagai Agensi Probiotik. *Jurnal Bioteknologi dan Biosains Indonesia*. 1: 9-15.
- Suryabrata, 2006. Metode Penelitian. Rajawali Press. Jakarta.

- Tahil, A.S., and Dy D. T. Effects of reduced pH on the early larval development of hatchery-reared Donkey's ear abalone, *Haliotis asinina* (Linnaeus 1758). *Aquaculture*. **459**:137–42.
- Takenaka, Y., K. Takeda, T. Yoshii, M. Hashimoto, and H. Inohara. 2012. Gram Staining for the Treatment of Peritonsillar Abscess. *International Journal of Otolaryngology*. 1-4.
- Tamayo, C. 2015. Clinical research on probiotics: the interface between science and regulatio. *Clinical Infectious Disease*. **46**: 5101-5103.
- Telli, G.S., J.T.R.P. Maria, C.D. Danielle de, R. S. Fabio, Carlos and M.I. Leonardo T. 2014. Dietary administration of *Bacillus subtilis* on hematology and non-specific immunity of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* raised at different stocking densities. *Fish and Shellfish Immunology*. **39**: 305-311.
- Terzic, A, and P. Raspor. 2015. Evaluation of autochthonous lactic acid bacteria as starter cultures for production of white pickled and fresh soft cheeses. *LWT - Food Science and Technology*, **63**: 298–30.
- Thorstad, E.B., N. Arığ, C. Suzer, A. Gökvardar, F. Başaran, D. Çoban, Ş. Yıldırım, H. O. Kamacı, K. Fırat, and Ş. Saka. 2013. The use of electronic tags in fish research - an overview of fish telemetry methods. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. **13**: 881–896.
- Touratierl, F., and A. Vezina. 1999. Model of bacterial growth influenced by substrate C: N ratio and concentration. *Aquatic Microbial Ecology*. **19**: 105-118.
- Tran-ngoc, K.T., N.T. Dinh, T.H. Nguyen, A.J. Roem, J.W. Schrama, Johan and A.J. Verreth. 2016. Interaction between dissolved oxygen concentration and diet composition on growth , digestibility and intestinal health of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*. **462**: 101–108.
- Triana, E., E. Yulianto, dan N. Novik. 2006. Uji viabilitas *Lactobacillus* sp. Mar 8 Terenkapsulasi. *Biodiversitas*. **7**: 114-117.
- Treasurer, J.W. 2012. Changes in pH during transport of juvenile cod *Gadus morhua* L. and stabilisation using buffering agents. *Aquaculture*. **330–333**: 92–99.
- Verma, V., S. A. Mrigank, R. G. Abhishek, S. Monika, and K. Akhilesh. 2011. Amylase production & purification from bacteria isolated from a waste potato dumpsite in district farrukhabad U. P State India. *Europen Journal of Experimental Biology*. **1**: 107–113.
- Vine, N. G. 2004. Towards The Development Of A Protocol For The Selection Of Probiotics In Marine Fish Larviculture. *Thesis. Doctor Of Philosophy*. Rhodes University.

- Vrede, T.1998. Elemental composition (C: N: P) and growth rates of bacteria and Rhodomonas grazed by Daphnia. *Journal of Palnktton Reasearch.* **20:** 455–470.
- Wang, H.L. and J. F.Cavins. 1989. Yield and amino acid composition of fractions obtained during tofu production. *Cereal Chem.* **66(5):**359- 361.
- Widanarni, W. H. Saputra, dan D. Wahjuningrum. 2011. Pengaruh penambahan molase terhadap kelangsungan hidup dan pertumbuhan larva udang windu *Penaeus monodon* Fab. yang diberi bakteri probiotik *Vibrio SKT-b*. *Jurnal Akuakultur Indonesia.* **10:** 106-115.
- Wiegel J dan L. Quandt. 1982. Determination of the Gram Type Using the Reaction Between Polymyxin B and Lipopolysaccharides of the Outer Cell Wall of Whole Bacteria. **128:** 2261-2270.
- Yuniarti, A., GuntoroD.A. and HariatiA.M.2013. Response of indigenous *Bacillus megaterium* supplementation on the growth of *Litopenaeus vannamei* (boone), a new target species for shrimp culture in east java of indonesia.*Journal of Basic and Applied Scientific Research.* **3:** 747–754.
- Yuniasari, D. danJ. Ekasari. 2010. Nursery culture performance of *litopenaeus vannamei* with probiotics addition and different C:N ratio under laboratory condition. *Hayati Journal of Biosciences.* **17:** 115–119.
- Zahangir, M., F. Haque, G. M. Mostakim, dan M. S. Islam. 2015. Secondary stress responses of zebrafish to different pH: Evaluation in a seasonal manner. *Aquaculture Reports.* **2:** 91–96.
- Zahran, E., R. Eny, A. Fatma, A. M. Hebata, dan T. Ibrahim. 2014. Effects of dietary Astragalus polysaccharides (APS) on growth performance, immunological parameters, digestive enzymes, and intestinal morphology of Nile tilapia (*Oreochromisniloticus*). *Fish and Shellfish Immunology.* **38:** 148-157.
- Zhang, X.Z., S. Noppadon, Z. Zhiguan, and Y.H.P Zhang. 2011. One-step production of lactate from cellulose as the sole carbon source without any other organic nutrient by recombinant cellulolytic *Bacillus subtilis*. *Metabolic Engineering.* **13:** 364–372.
- Zheng F, Liu H, Sun X, Qu L, Dong shuanglin, and Liu J. 2012. Selection, identification and application of antagonistic bacteria associated with skin ulceration and peristome tumescence of cultured sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka). *Aquaculture.* **334–337:** 24–9.
- Ziaeinejad, S., H.R. Mehran, A.T. Ghobad, L.L. Donald, M. Ali-Reza, and S. Mehdi. 2005. The effect of *Bacillusspp*.bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeusindicus*. *Aquaculture Article in Press.*

