

THE BACTERIOCIN ANTIMICROBIAL TEST ACTIVITY OF PROBIOTIC BACTERIA ISOLATED FROM GIANT PRAWNS

(*Macrobrachium rosenbergii*)

Popy Wardani¹, Feliatra², Andi Dahliaty³

Marine Science Department, Faculty of Fisheries and Marine Science,
University of Riau Pekanbaru Riau Province
popywardani@gmail.com

ABSTRACT

This research was conducted to test the antimicrobial activity of bacteriocin isolates of probiotic bacteria isolated from giant prawns (*Macrobrachium rosenbergii*). The method used was experiment method with tested the inhibition against pathogenic bacteria (*Vibrio alginolyticus*, *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas stutzeri*). The results showed that bacteriocin capable of inhibiting the growth of pathogenic bacteria of *P. stutzeri*, *A. hydrophila* and *V. alginolyticus*. The best isolates obtained from results of this research was UG4 with clear zones ranging from 7.2 to 11.4 mm and the inhibition activity of 1476.53 mm²/mL after fragmentation with (NH₄)₂SO₄ against pathogenic bacteria *P. stutzeri* was incubated at room temperature (37°C). This inhibition was caused by the presence of antimicrobial compounds that are produced by probiotic bacteria, namely bacteriocin. For isolates UG2 codes, the bacteria was resistant in which characterized by the formation of blurring zone around the paper disc.

Key words: Antimicrobial activity, probiotics, bacteriocins, giant prawns

-
1. Student at Faculty of Fishery and Marine Science University of Riau.
 2. Lecturers at Faculty of Fishery and Marine Science University of Riau.

PENDAHULUAN

Bakteri probiotik merupakan mikroba hidup yang jika dikonsumsi akan menimbulkan efek terapeutik dan manfaat kesehatan bagi penjamu (Kaboosi, 2011). Agen antibakteri seperti asam laktat dan bakteriosin yang dimiliki bakteri probiotik dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen (Fauziah *et al.*, 2013). Hal ini dikarenakan agen antibakteri mampu menurunkan pH menjadi rendah sehingga bakteri patogen sulit bertahan hidup (Tambekar and Bhutada, 2010). Feliatra *et al.*, (2015) menemukan 11 spesies bakteri yang

berpotensi sebagai probiotik di saluran pencernaan Udang Galah (*Macrobrachium rosenbergii*) yang didominasi oleh spesies *Bacillus* sp.

Pada stadium larva, Udang Galah (*Macrobrachium rosenbergii*) hidup pada perairan yang bersalinitas dan setelah dewasa kembali keperairan tawar. Kelebihan bakteriosin yang dihasilkan dari usus udang galah yaitu karena udang mencari makan di dasar perairan (*benthic*) dan udang merupakan hewan pemakan segala macam bangkai (*omnivorous scavenger*) sehingga dimungkinkan dalam ususnya banyak mengandung BAL (bakteri asam laktat). Menurut Buntin *et al.*, 2008 mengatakan air tawar dan air laut merupakan sumber dari BAL sehingga usus udang dan binatang lain dalam air merupakan tempat penyimpanan (*reservoir*) alami bagi BAL.

Bakteri asam laktat merupakan kelompok bakteri Gram positif (Hendriani *et al.*, 2009). Bakteri asam laktat merupakan kelompok bakteri yang paling banyak menghasilkan bakteriosin. Bakteriosin lebih kuat sifat antibakterinya pada bakteri yang memiliki kekerabatan secara filogenik (Najmuddin, 2006). Menurut Nester *et al.*, (2009) mekanisme aksi antimikroba bakteriosin ada 4 cara, yaitu dengan menghambat sintesis dinding sel, sintesis protein, sintesis asam nukleat, dan jalur metabolisme utama.

Bakteriosin merupakan senyawa antimikroba sejenis protein yang mudah didegradasi oleh enzim proteolitik dalam pencernaan manusia dan hewan yang dapat menghambat pertumbuhan spesies yang biasanya berkerabat (filogenik) dekat dengan sel penghasilnya. Saat ini penggunaan bakteriosin telah banyak menjadi perhatian karena senyawa tersebut sangat potensial digunakan sebagai pengawet dalam industri makanan terutama makanan yang difermentasi (Dobson *et al.*, 2011).

Dalam dunia pembudidayaan perikanan masalah yang sering muncul yaitu penyakit yang disebabkan oleh bakteri patogen yaitu seperti *Vibrio alginolyticus*, *Pseudomonas stutzeri* dan *Aeromonas hydrophila*. Dengan adanya kondisi budidaya perikanan yang mengalami kegagalan akibat terserang penyakit, maka perlu dilakukan penelitian untuk melihat daya hambat bakteriosin terhadap bakteri patogen.

Tujuan penelitian ini secara umum adalah untuk mengetahui daya hambat bakteriosin terhadap bakteri patogen. Bakteriosin yang diperoleh dari hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi bahan untuk uji lanjutan pada pakan udang atau ikan serta dapat diaplikasikan dalam memperbaiki dan menutrisi pakan pada budidaya ikan.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Februari - April 2015 di Laboratorium Riset Enzim, Fermentasi dan Biomolekuler, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari autoklaf, spektrofotometer UV-Vis Thermo Scientific Genesys 10S, *shaking incubator*,

sentrifuse, *waterbath*, *incubator*, jarum ose, *vortex mixer* H-VM-300, *petridish*, tabung reaksi, *beaker glass*, Erlenmeyer, timbangan analitik, eppendorf, *glasswool*, *hot plate stirrer*, jangka sorong dan peralatan standar lainnya sesuai dengan prosedur kerja di laboratorium.

Bakteri probiotik menghasilkan senyawa bakteriosin. Setiap isolat bakteri diujikan pada bakteri patogen yaitu *V. alginolyticus*, *P. stutzeri*, dan *A. hydrophila*, perlakuan dilakukan 3 kali pengulangan.

Prosedur Penelitian

Media NA digunakan untuk peremajaan isolat bakteri probiotik yang diisolasi dari udang galah (*Macrobrachium rosenbergii*). Sebanyak 2 g media NA dilarutkan dalam 100 mL akuades lalu dididihkan sebentar hingga campuran larut. Larutan media disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada tekanan 15 lb, 121°C selama 15 menit.

Untuk pembuatan agar miring, larutan media dituang sebanyak 8 mL ke dalam tabung reaksi bertutup kapas. Tabung-tabung tersebut dimiringkan 45° lalu diinkubasi pada suhu kamar selama lebih kurang 24 jam. Media dapat digunakan jika tidak ada tanda-tanda kontaminasi dan tidak terdapat uap air.

Media NB digunakan untuk peremajaan bakteri patogen sebelum uji antibakteri. Sebanyak 2,4 g NB (*pepton from meat*, glukosa dan *buffer phosphate*) dilarutkan dalam 300 mL aquaDM. Media disterilisasi menggunakan autoklaf pada tekanan 15 lb, 121°C selama 15 menit. Setelah media dingin, bakteri patogen diinokulasikan dengan menggunakan ose steril. Lalu diinkubasi di dalam inkubator selama ± 24 jam pada suhu 37°C.

Media cair untuk produksi bakteriosin

Media cair yang digunakan untuk produksi bakteriosin adalah media *Nutrient Broth* dengan volume 300 mL (Sharma dan Guatam, 2011). Media disterilisasi di dalam autoklaf pada tekanan 15 lb, 121°C selama 15 menit. Media cair untuk produksi bakteriosin diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruangan. Setelah 24 jam diukur OD (*Optical Density*) menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 650 nm setara dengan 10^7 CFU/mL (Khoiriyah *et al.*, 2014). Apabila nilai OD lebih besar dari 0,1 maka sebaiknya dilakukan pengenceran dengan menggunakan larutan fisiologis (NaCl) 0,85%. Kemudian sebanyak 10% inokulum bakteri probiotik diinokulasikan kedalam media yang sebelumnya telah diinkubasi selama 24 jam. Media yang berisi inokulum tersebut lalu difermentasi menggunakan *shaking incubator* pada kecepatan 150 rpm, selama ± 24 jam pada suhu 37°C (Martins *et al.*, 2011).

Isolasi ekstrak kasar bakteriosin

Ekstrak kasar bakteriosin diisolasi dari media cair yang sudah difermentasi selama 24 jam menggunakan *shaking incubator* pada suhu 37°C. Media produksi didinginkan di dalam lemari pendingin selama ± 1 jam pada suhu 5-10°C. Setelah itu, media disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Ekstrak bakteriosin dipisahkan dari endapan dengan menggunakan penyaringan *glasswool*. Ekstrak bakteriosin (Cr) yang dihasilkan sebagian disimpan didalam *eppendorf* untuk diuji aktivitas bakteriosinnya dengan metode

cakram dan sebagian lagi diendapkan dengan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Ammonium sulfat). Hasil fragmentasi (Bc) diuji aktivitasnya dengan cara yang sama.

Fragmentasi bakteriosin

Bakteriosin yang diendapkan dengan penambahan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dilakukan dalam keadaan dingin ($5-10^\circ\text{C}$) sambil diaduk hingga mencapai tingkat kejenuhan 80%. Larutan dibiarkan selama 30 menit sambil diaduk. Endapan yang terbentuk lalu dipisahkan dari supernatan dengan sentrifugasi dalam keadaan dingin menggunakan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan bakteriosin dituang dan disimpan dalam erlenmeyer steril. Endapan yang diperoleh, ditambahkan dengan larutan buffer posfat 0,05 M pH 7,0.

Fragmen bakteriosin (Bc) yang diperoleh dari hasil pengendapan disimpan di dalam *eppendorf* dalam keadaan dingin yang nantinya akan diuji aktivitasnya dengan metode cakram.

Uji aktivitas bakteriosin

Bakteri uji yang digunakan (*V. alginolyticus*, *P. stutzeri* dan *A. hydrophila*) yang disimpan dari agar miring dipindahkan ke media *Nutrient Agar* yang baru secara aseptis dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C . Setelah inkubasi selama 24 jam, koloni bakteri yang tumbuh diinokulasikan ke media *Nutrient Broth* dan diinkubasi kembali selama 24 jam pada suhu 37°C . Bakteri siap digunakan untuk uji antibakteri apabila OD bakteri tersebut telah mencapai 0,08-0,1 (setara 10^7 CFU/mL). Apabila nilai OD lebih besar dari 0,1 maka sebaiknya dilakukan pengenceran dengan menggunakan larutan fisiologis (NaCl) 0,85% (Martins *et al.*, 2011).

Setelah bakteri uji siap maka dilanjutkan dengan pengujian daya hambat bakteriosin terhadap bakteri patogen dengan menggunakan metode cakram. Bakteriosin ditetaskan sebanyak 50 μL pada kertas cakram berukuran diameter 6 mm kemudian didiamkan sampai mengering, lalu diletakkan pada permukaan cawan petri yang berisi media NA yang sudah dicampur dengan bakteri patogen (Buntin *et al.*, 2008). Bakteri diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C . Setelah inkubasi selama 24 jam dilakukan pengukuran diameter aktivitas bakteriosin yang dihasilkan dengan menggunakan jangka sorong.

Perhitungan Aktivitas Hambat Bakteriosin

Menurut Usmiati (2007), aktivitas bakteriosin dapat dihitung dengan menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas bakteriosin (mm}^2\text{/ml)} = \frac{\text{Lz-Ls}}{\text{V}}$$

Keterangan:

Lz = Luas zona bening ($\text{mm}^2\text{/mL}$)

Ls = Luas cakram ($6 \text{ mm}^2\text{/mL}$)

V = Volume sampel (μl)

(50 μl setara dengan 0,05 mL)

Kriteria kekuatan antibakteri (Hidayati, 2009) dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Ketentuan Potensi Antibakteri

No	Daerah Hambatan	Ketentuan
1	>20 mm	Sangat Kuat
2	10-20 mm	Kuat
3	5-10 mm	Sedang
4	<5 mm	Lemah

HASIL DAN PEMBAHASAN

Daya hambat bakteriosin terhadap patogen *V. alginolyticus* berkisar dari yang terendah 6,8-10,25 mm, terhadap bakteri patogen *P. stutzeri* berkisar dari yang terendah 6,8-11,4 mm dan terhadap *A. hydrophila* berkisar dari 6,2-10,71 mm (Lampiran 10). Besar aktivitas hambat ekstrak bakteriosin (Cr) dan fragmen bakteriosin (Bc) dapat dilihat pada Tabel 2 sampai dengan Tabel 4.

Tabel 2. Aktivitas Hambat Ekstrak Bakteriosin (Cr) dan Fragmen Bakteriosin (Bc) terhadap Bakteri *V. alginolyticus*

Isolat	Aktivitas hambat (Cr) terhadap <i>P. stutzeri</i> (mm ² /mL)	Aktivitas hambat (Bc) terhadap <i>P. stutzeri</i> (mm ² /mL)
UG1	162,75±94,69	334,13 ±49,80
UG2	255,77±188,99	578,49 ±55,49
UG3	331,98 ±198,42	588,68±431,19
UG4	948,07±422,91	1.093,12±270,81
UG5	317,20±112,74	578,49 ±55,49

Hasil pengukuran aktivitas hambat ekstrak bakteriosin (Cr) terhadap bakteri *V. alginolyticus* menunjukkan bahwa UG4 memiliki aktivitas hambat yang paling tinggi yaitu sebesar 948,07 mm²/mL dan aktivitas hambat terendah pada UG1. Aktivitas hambat fragmen bakteriosin tertinggi juga terdapat pada UG4 yaitu sebesar 1.093,12 mm²/mL dan aktivitas hambat terendah terdapat pada UG1.

Tabel 3. Aktivitas Hambat Ekstrak Bakteriosin (Cr) dan Fragmen Bakteriosin (Bc) terhadap Bakteri *P. stutzeri*

Isolat	Aktivitas hambat (Cr) terhadap <i>P. stutzeri</i> (mm ² /mL)	Aktivitas hambat (Bc) terhadap <i>P. stutzeri</i> (mm ² /mL)
UG1	160,5 ±44,72	455,73±173,93
UG2	182,91 ±114,15	454,34±151,54
UG3	317,11 ±235,36	770,87±570,42
UG4	412,73 ±209,53	1.476,53±129,85
UG5	337,55 ±263,36	461,59±341,75

Hasil pengukuran aktivitas hambat ekstrak bakteriosin (Cr) terhadap bakteri *P. stutzeri* menunjukkan bahwa UG4 memiliki aktivitas hambat yang paling tinggi yaitu sebesar 412,73 mm²/mL dan aktivitas hambat terendah pada UG1. Aktivitas hambat fragmen bakteriosin tertinggi juga terdapat pada UG4 yaitu sebesar 1.476,53 mm²/mL dan aktivitas hambat terendah terdapat pada UG2.

Tabel 4. Aktivitas Hambat Ekstrak Bakteriosin (Cr) dan Fragmen Bakteriosin (Bc) terhadap Bakteri *A. hydrophila*

Isolat	Aktivitas hambat (Cr) terhadap <i>A. hydrophila</i> (mm ² /mL)	Aktivitas hambat (Bc) terhadap <i>A. hydrophila</i> (mm ² /mL)
UG1	245,88 ±31,49	519,87±108,05
UG2	58,09 ±27,97	128,08 ±39,09
UG3	249,52 ±217,05	490,88 ±400,69
UG4	444,72 ±179,88	1.246,17 ±339,09
UG5	280,22 ±113,42	669,03 ±79,57

Hasil pengukuran aktivitas hambat ekstrak bakteriosin (Cr) terhadap bakteri *A. hydrophila* menunjukkan bahwa UG4 memiliki aktivitas hambat yang paling tinggi yaitu sebesar 444,72 mm²/mL dan aktivitas hambat terendah pada UG2. Aktivitas hambat fragmen bakteriosin tertinggi juga terdapat pada UG4 yaitu sebesar 1.246,17 mm²/mL dan aktivitas hambat terendah terdapat pada UG2.

PEMBAHASAN

Hasil uji aktivitas bakteriosin ditunjukkan dengan adanya aktivitas penghambatan terhadap bakteri patogen yang diketahui setelah inkubasi selama 24 jam. Aktivitas bakteriosin ditandai dengan adanya zona bening di sekitar kertas cakram. Zona bening timbul karena bakteri patogen tidak dapat tumbuh. Hal ini menunjukkan adanya aktivitas bakteriosin sebagaimana dipaparkan oleh Romadhon *et al.*, (2012), zona bening terbentuk karena bakteriosin memberikan efek penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri indikator. Zona bening yang timbul sangat bervariasi. Menurut Rai (2009) bakteriosin menghasilkan zona bening yang jelas, bulat, dan luas. Jika tidak demikian diperkirakan akibat aktivitas asam, hidrogen peroksida, atau diasetil. Kemampuan membentuk zona bening berbeda-beda tergantung jenis bakteri, dan konsentrasi bakteriosin.

Bakteriosin merupakan senyawa protein yang dieksresikan oleh bakteri probiotik yang bersifat antimikroba yang mampu menekan pertumbuhan bakteri patogen. Perbedaan besar daerah hambat pertumbuhan yang dibentuk pada setiap bakteri disebabkan perbedaan aktivitas hambat yang dipengaruhi oleh jenis dinding sel bakteri yang dihambat. Hal ini berpengaruh terhadap ketahanan suatu bakteri terhadap zat antimikroba karena perbedaan struktur dinding selnya. Aktivitas produksi bakteriosin oleh bakteri probiotik dipengaruhi oleh faktor pH, suhu, sumber karbon, serta fase pertumbuhan. Jenis sumber karbon dan nitrogen yang digunakan dalam medium produksi mempengaruhi laju pertumbuhan sel

bakteri probiotik, yang selanjutnya berpengaruh terhadap metabolisme produksi bakteriosin (Fauziah *et al.*, 2013).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa isolat UG4 memiliki daya hambat terhadap bakteri *V.alginolyticus*, *P. stutzeri* dan *A. hydrophila* yang diinkubasi pada suhu ruangan (37° C). Daya hambat ini disebabkan oleh adanya senyawa yang bersifat antimikroba yaitu bakteriosin. Menurut Romadhon *et al* (2012), adanya perbedaan daya antimikroba dikarenakan perbedaan jenis bakteri sehingga spesies yang berbeda akan menghasilkan penghambatan dan aktivitas yang berbeda karena perbedaan komponen metabolit yang dihasilkan.

Target utama bakteriosin adalah membran sitoplasma sel mikroba patogen. Tahap awal bakteriosin adalah merusak permeabilitas membran dan menghilangkan *proton motive force* (PMF), sehingga menghambat produksi energi dan biosintesis protein. Mekanisme aktivitas bakterisidal bakteriosin adalah bakteriosin kontak langsung dengan membran sel. Proses kontak ini mampu mengganggu potensial membran berupa destabilitas membran sitoplasma, sehingga sel menjadi tidak kuat. Ketidakstabilan membran mampu memberikan dampak pembentukan lubang atau pori pada membran sel bakteri patogen melalui proses gangguan terhadap PMF. Kebocoran yang terjadi akibat pembentukan lubang pada membran sitoplasma tersebut ditunjukkan oleh adanya aktivitas keluar masuknya molekul seluler. Kebocoran ini berdampak pada penurunan pH seluler. Pengaruh pembentukan lubang sitoplasma merupakan dampak adanya bakteriosin yang menyebabkan terjadinya perubahan gradien potensial membran dan pelepasan molekul interseluler maupun masuknya substansi ekstraseluler. Peristiwa tersebut berpengaruh pada terhambatnya pertumbuhan sel bakteri patogen dan mampu menyebabkan kematian pada sel bakteri yang sensitif terhadap bakteriosin (Usmiati *et al.*, 2009).

Bakteriosin disintesis selama fase pertumbuhan eksponensial. Perpanjangan waktu inkubasi setelah fase stationer menyebabkan aktivitas bakteriosin menurun karena terbebasnya protease dari sel pada saat sel memasuki fase kematian. Bakteriosin merupakan suatu senyawa protein yang memiliki sifat bakterisidal terhadap bakteri patogen Gram positif dan negatif. Bakteriosin memiliki spektrum yang luas terhadap bakteri target yang memiliki sifat pengikatan spesifik (Fauziah *et al.*, 2013)

Pseudomonas stutzeri sensitif terhadap bakteriosin, hal ini dapat dilihat dari kemampuan hambat UG4 yang diinkubasi selama 24 jam. Hal ini dapat dilihat dengan adanya zona bening yang lebih luas dari pada bakteri uji yang lain yaitu sebesar 11,4 mm dan aktivitas hambat sebesar 1475 mm²/ml. Sensitifitas bakteri Gram negatif oleh aktivitas antimikroba bakteriosin lebih tinggi dibandingkan dengan Gram positif, karena struktur dinding selnya memiliki membran luar yang tersusun atas lipopolisakarida (LPS), lipoprotein, dan fosfolipid (Leroy, 2007).

Isolat bakteri UG2 bersifat resisten ditandai dengan adanya zona keruh yang terbentuk pada uji daya hambat terhadap bakteri patogen *V. Alginolyticus*, *P.stutzeri*, dan *A. hydrophila* diduga senyawa yang terkandung dalam bakteriosin hanya mampu merusak lapisan luar bakteri patogen (lapisan lipopolisakarida). Hal ini menyebabkan bakteri tersebut mampu memperbaiki kembali kerusakan

membran luar, dan tumbuh kembali sehingga menimbulkan zona keruh pada uji tersebut (Romadhon *et al.*, 2012).

KESIMPULAN DAN SARAN

Hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa 5 isolat penghasil bakteriosin mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen *P. stutzeri*, *A. hydrophila* dan *V. alginolyticus*. Isolat terbaik diperoleh dari hasil penelitian ini yaitu UG4 dengan zona hambat berkisar antara 7,2-11,4 mm dan aktivitas hambat sebesar 1476,53 mm²/mL setelah diendapkan dengan (NH₄)₂SO₄ terhadap bakteri patogen *P. stutzeri* yang diinkubasi pada suhu ruangan (37°C). Daya hambat ini disebabkan oleh adanya senyawa yang bersifat antimikroba yaitu bakteriosin. Pada isolat dengan kode UG2, bakteri bersifat resisten yaitu ditandai dengan terbentuknya zona keruh disekililing kertas cakram.

Diharapkan hasil penelitian ini bisa dilanjutkan untuk memproduksi bakteriosin yang maksimum dengan mengatur kondisi yang optimum dari mikroba probiotik seperti suhu, pH, nutrisi (sumber karbon, nitrogen, unsur hara), dan aerasi. Untuk penelitian lebih lanjut bakteriosin bisa diaplikasikan sebagai bahan campuran pakan sehingga berguna dalam pengendalian penyakit ikan budidaya dan menekan pertumbuhan bakteri patogen serta berguna dalam pengembangan ilmu yang berbasis bioteknologi laut.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada ketua Jurusan Ilmu Kelautan Faperika Universitas Riau beserta jajaran staf yang telah memberikan kemudahan dalam administrasi penelitian. Terimakasih juga penulis ucapkan kepada dosen pembimbing bapak Prof. Dr. Ir. Feliatra, DEA dan ibu Dra. Andi Dahliaty, M.S yang telah banyak memberi masukan selama penelitian dan dalam penyempurnaan penulisan penulis. Terimakasih juga kepada rekan-rekan yang telah membantu Widya dan Eva, Anita, Martinus, Ivan, Jonathan Bornok, Massugito, Azizah, Gustini dan semua pihak yang terlibat dalam membantu penyempurnaan penelitian penulis. Semoga penelitian ini bermanfaat, terima kasih.

DAFTAR PUSTAKA

- Buntin, N., Cahanthachum, S., Hongpattarakere, T. 2008. Screening of lactic acid bacteria from gastrointestinal tracts of marine fish for their potential use probiotics. *Sonklanakar Journal Science Technology* vol. 30. 141-148.
- Dobson A, O'Sullivan O, Cotter PD, Ross P, Hill C. 2011. High through put sequence-based analysis of the bacterial composition of kefir and an associated kefir grain. *FEMS Microbiol Lett.* 320:56-62.
- Fauziah, P.N., Nurhajati, J., & Chrysanti. 2013. Daya Antibakteri Filtrat Asam Laktat Dan Bakteriosin *Lactobacillus Bulgaricus* Dalam Soygurt Terhadap Pertumbuhan *Klebsiella pneumonia*. *Bionatura Jurnal Ilmu-ilmu Hayati dan Fisik.* Vol. 15, No. 2, Juli 2013: 132 – 138.
- Feliatra, Yoswaty, D., Lukystyowati, I., Nugroho, Titania, Hasyimi, H., 2015. The Potential of The Isolated Probiotics Bacterial From Giant Prawns' Digestive Tract (*Macrobrachium rosenbergii*, De Man) With 16s Rdna Sequencing Technique. *International Journal of Oceans and Oceanography* vol. 9, No. 1, 1-10.
- Hendriani, R., Tina R., dan Sri A.G.K. 2009. Penelusuran Antibakteri Bakteriosin dari Bakteri Asam Laktat Dalam Yoghurt Asal Kabupaten Bandung Barat Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Padjadjaran. Bandung
- Hidayati, N. 2009. Uji Efektivitas Antibakteri Ekstrak Kasar Daun Teh (*Camellia sinensis* L.v. *assamica*) Tua Hasil Ekstraksi menggunakan pelarut akuades dan Etanol. *Skripsi*. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Islam Negeri Malang. Malang.
- Kaboosi, H. 2011. Antibacterial effects of probiotics isolated from yoghurt against some common bacterial pathogens. *Afr J Microbiol Res*, 5(25):4363–4367.
- Khoiriyah, H., Ardiningsih, P., Jayuska, A. 2014. Penentuan Waktu Inkubasi Optimum Terhadap Aktivitas Bakteriosin *Lactobacillus* Sp. Red4. *Jurnal tahun 2014*, volume 3 (1), halaman 7-12.
- Leroy, L.D.V.F., 2007, Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications, *J Microbiol Biotechnol.* 13:194–199.
- Martin D.D., Wit J.M, Hochberg Z, Savendahl L, Rijn R.R, Fricke O. 2011. The use of bone age in clinical practise-part 1. *Horm Res Paediatr.* 76:1-9
- Najmuddin, A. 2006. Aktivitas Antimikroba Yogurt Probiotik Dari Susu Kambing Saanen Dan Pesa (Persilangan Peranakan Etawah Dan Saanen) Selama Penyimpanan. *Skripsi* Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor. Bogor.

- Nester. E., W, Anderson., Dennis, G., Roberts. C. Evans Jr, Nester, Martha T. 2009. *Microbiology a Human Perspective 6th Edition*. McGraw-Hill : New York.
- Rai, A.K., Bhaskar, N., amani, P.M., Indirani, K., Suresh, P.V., Mahendrakar, N.S. 2009. Characterization and application of native lactic acid bacterium isolated from tannery fleshing for fermentative bioconversion of tannery fleshings. *Application Microbiology Biotechnology* 83. 757- 766.
- Romadhon, Subagiyo, Sebastian Margino. 2012. Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Dari Usus Udang Penghasil Bakteriosin Sebagai Agen Antibakteria Pada Produk-Produk Hasil Perikanan. *Jurnal Saintek Perikanan* Vol. 8. No. 1, 2012.
- Sharma, N., dan Guatam, N., 2011, Antibacterial activity and characteritation of bacteriocin of bacillus mycoides isolated from whey, *Indian journal of biotechnology*, 7: 117-121.
- Tambekar, D.H., & Bhutada, S.A. 2010. An evaluation of probiotic potential of *Lactobacillus* sp. from milk of domestic animals and commercial available probiotic preparations in prevention of enteric bacterial infections. *Recent Research Science and Technology*, 2(10):82–88.
- Usmiati, S., Marwati, T. 2007. Seleksi dan Optimasi Proses Produksi Bakteriosin dari *Laktobacillus* sp. *Jurnal Pascapanen* 4. 27-37.
- Usmiati, S., Miskiyah, & Rarah, R.A.M. 2009. Pengaruh penggunaan bakteriosin dari *Lactobacillus* sp. galur SCG 1223 terhadap kualitas mikrobiologi daging sapi segar. *JITV*,14(2):150–166.