

Histopatologi Ikan Kerapu Macan yang Diimbuhi Bakteri Asam Laktat dan Diuji Tantang *Vibrio alginolyticus*

(HISTOPATHOLOGY OF TIGER GROUPEL SUPPLEMENTED WITH LACTIC ACID BACTERIA AND CHALLENGED BY VIBRIO ALGINOLYTICUS)

Nursyirwani¹, Widya Asmara²,
Agnesia Endang Tri Hastuti Wahyuni², Triyanto³

¹Laboratorium Mikrobiologi Laut, Jurusan Ilmu Kelautan,
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Riau
Kampus Bina Widya Km. 12,5 Simpang Baru, Panam, Pekanbaru 28293

²Program Studi Sain Veteriner,

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada

³Jurusan Perikanan, Fakultas Pertanian, UGM

Telepon (0761)-63274/63275, E-mail: nursyirwani_adnan@yahoo.com

Abstrak

Pemberian probiotik berupa bakteri asam laktat (BAL) dalam akuakultur telah diketahui dapat meningkatkan pertumbuhan ikan dan resistensi terhadap penyakit. Penelitian ini bertujuan untuk melihat gambaran histopatologi ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) yang diimbuhi isolat BAL dan diuji tantang dengan *Vibrio alginolyticus*. Penelitian ini menggunakan empat perlakuan, yaitu ikan diberi pakan pelet (kontrol=P0); ikan diberi pakan ditambah isolat kerapu situbondo usus (KSBU 12C = P1); ikan diberi pakan ditambah isolat KSBU 5Da (P2); dan ikan diberi pakan ditambah isolat KSBU 9 (P3) dengan kepadatan 10^6 sel/g. Pemberian pakan probiotik dilakukan selama 28 hari. Pemeriksaan histologi dilakukan terhadap lambung, usus, hati, ginjal dan jantung. Tingkat kelangsungan hidup ikan pada perlakuan P3, P2, P1, dan P0 berturut-turut adalah $90,00 \pm 10,00\%$; $96,67 \pm 5,77\%$; $93,30 \pm 5,77\%$; dan $73,30 \pm 28,87\%$. Pemberian pakan ditambah BAL pada ikan kerapu diikuti dengan uji tantang, dengan menginjeksi intraperitoneal (IP) *V. alginolyticus* tidak dapat menekan kerusakan pada organ yang diamati, yaitu terjadinya kongesti pada insang, hati dan ginjal, epikarditis, dan radang granuloma lambung. Namun pada lapisan epitel usus ikan terlihat adanya pembentukan sel goblet yang berfungsi mensekresi mukus.

Kata-kata kunci: histopatologi, ikan kerapu macan, bakteri asam laktat

Abstract

Supplementation of lactic acid bacteria (LAB) as probiotic in aquaculture has been reported to increase fish growth and enhance their resistance against diseases. The aim of this study was to figure out histological changes of tiger grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) fed with LAB isolates followed by challenge with *V. alginolyticus*. Four treatments applied were fish fed basal pellet as control (P0), fish fed with KSBU 12C isolate (P1), fish fed with KSBU 5Da isolate (P2) and fish fed with KSBU 9 isolate (P3) at density of 10^6 cells/g. The probiotics was supplemented for 28 days. Internal fish organ such as stomach, intestine, liver, kidney and heart were collected and processed for histological examination. The fish survival rate for the following treatment, P3, P2, P1 and P0 were $90.00 \pm 10.00\%$, $96.67 \pm 5.77\%$, $93.30 \pm 5.77\%$ and $73.30 \pm 28.87\%$ respectively. Fish fed with diet supplemented with LAB and followed by intraperitoneal injection (IP) of *V. alginolyticus* was unable to suppress the damage on organs by the bacteria. Congestion was found in gills, liver and kidney; epicarditic in heart and stomach granulomata. Nevertheless, supplementation of probiotic resulted in goblet cell formation in epithelial lining of fish intestine which functions to secrete mucus.

Key words: Histopathology, tiger grouper, lactic acid bacteria

PENDAHULUAN

Probiotik telah lama digunakan dalam kegiatan akuakultur, terutama untuk meningkatkan pertumbuhan dan resistensi terhadap penyakit. Probiotik membantu efisiensi konversi pakan dan pencapaian bobot ikan hidup (Al-Dohail *et al.*, 2009; Saenz de Rodriguez *et al.*, 2009), dan memberi perlindungan terhadap patogen melalui eksklusi kompetitif terhadap situs adesi (Vine *et al.*, 2004; Chabrillon *et al.*, 2006), produksi asam-asam organik (asam format, asam asetat, asam laktat), hidrogen peroksida dan beberapa senyawa lain seperti antibiotik, bakteriosin, sideropora, lisozim (El-Dakar *et al.*, 2007; Sugita *et al.*, 1998; Yan *et al.*, 2002) dan memodulasi sistem imun (Nayak, 2010).

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan kelompok bakteri Gram positif yang telah banyak digunakan sebagai probiotik dalam akuakultur, terutama dalam meningkatkan respons imun ikan. Nilai hematokrit, uji *nitro blue tetrazolium* (NBT), penempelan netrofil, dan aktivitas lisozim menunjukkan peningkatan yang signifikan pada ikan nila tilapia (*Oreochromis niloticus*) yang diberi campuran *Bacillus subtilis* dan *Lactobacillus acidophilus* (Aly *et al.*, 2008). Pemberian *L. plantarum* pada ikan nila secara signifikan meningkatkan aktivitas fagositosis dan aktivitas lisozim (El-Ezaby *et al.*, 2011). Pemberian pakan probiotik *L. plantarum* meningkatkan pertumbuhan, respons imun alami, dan resistensi terhadap *Streptococcus* sp. dan *iridovirus* pada ikan kerapu jenis *Epinephelus coioides* (Son *et al.*, 2009).

Bakteri asam laktat telah berhasil diisolasi dari ikan kerapu macan. Pada penelitian terdahulu, dari uji antagonisme terhadap bakteri *V. alginolyticus* secara *in vitro*, didapatkan 20 isolat yang berpotensi sebagai probiotik (Nursyirwani *et al.*, 2011). Tiga dari 20 isolat tersebut telah diujikan pada ikan kerapu macan secara *in vivo* melalui suplementasi pada pakan, dan menunjukkan adanya peningkatan respons imun non spesifik (nilai hematokrit, total leukosit, persentase heterofil, monosit dan limfosit, dan aktifitas fagositosis) selama pemberian pakan probiotik dan setelah diuji tantang dengan *V. alginolyticus* (Nursyirwani *et al.*, 2013). Namun, belum diketahui pengaruh pemberian BAL terhadap perubahan histopatologi ikan kerapu macan. Penelitian ini bertujuan untuk melihat gambaran histo-

patologi pada organ-organ insang, lambung, usus, hati, ginjal dan jantung ikan kerapu macan yang disuplementasi isolat BAL dan setelah diuji tantang dengan *V. alginolyticus*.

METODE PENELITIAN

Pemberian Pakan Probiotik

Penelitian ini dilakukan di Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara, Jawa Tengah. Sebelum pakan probiotik diberikan, ikan kerapu macan sebanyak 500 ekor dengan ukuran 10-15 cm terlebih dahulu diadaptasikan dalam bak penampungan (bak fiber volume 500 liter) selama tujuh hari. Ikan diberi pakan pelet untuk kerapu (MarinXcel 5011; PT. Cargill Indonesia) sebanyak 3% dari bobot ikan dengan frekuensi 2-3 kali per hari. Selanjutnya sebanyak 25 ekor ikan, masing-masing dimasukkan ke dalam 12 bak fiber yang berukuran 500 liter, dengan kepadatan 25 ekor/bak.

Penelitian ini menggunakan empat perlakuan: ikan diberi pakan dasar (P0=kontrol); ikan diberi pakan ditambah isolat KSBU (K=Kerapu, SB=Situbondo, U=usus) 12C (P1); ikan diberi pakan ditambah isolat KSBU 5Da (P2); dan ikan diberi pakan ditambah isolat KSBU 9 (P3). Kepadatan bakteri probiotik yang ditambahkan pada pakan untuk setiap perlakuan adalah 10^6 sel/g. Setiap perlakuan diulang sebanyak tiga kali. Pemberian pakan probiotik dilakukan selama 28 hari. Selanjutnya, sebanyak 10 ekor ikan dari setiap bak perlakuan diinfeksi dengan suspensi *V. alginolyticus* sebanyak 0,1 mL suspensi *V. alginolyticus* dalam *nutrient broth* (NB) dengan konsentrasi 10^9 sel/mL secara *intraperitoneal* (IP).

Pengamatan Gejala Klinis Eksternal dan Histopatologi

Selama tujuh hari pemeliharaan setelah diinfeksi, ikan diamati setiap hari terhadap munculnya gejala klinis dan mortalitas. Pengamatan meliputi gerakan ikan, reaksi terhadap rangsangan, nafsu makan, pernafasan, posisi ikan dalam akuarium, perubahan warna badan, jumlah lendir, dan adanya *gripsis*.

Pemeriksaan histologi dilakukan di Laboratorium Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada. Bahan kimia yang digunakan adalah formalin 10%, etanol (80%, 95%, 100%), xylene, parafin, hematoxylin acid alkohol 1% dan eosin. Peralatan yang

digunakan antara lain adalah *dissecting set*, *microtome* tipe Yamato RV-240, *tissue embedding center*, *cassette*, *slide warmer* tipe Sakura *Slide Warmer* PS-53, gelas objek, dan mikroskop.

Pemeriksaan histologi dilakukan terhadap organ internal menurut prosedur Darjono *et al.* (2001). Spesimen insang, lambung, usus, hati, ginjal, dan jantung ikan kerapu macan difiksasi dalam larutan formalin buffer 10% selama ±24 jam, jaringan dipotong setebal 3-5 mm dan 1×1 cm, kemudian dimasukkan ke dalam *cassette* untuk diproses ke dalam etanol 80%, 95% sebanyak dua kali, etanol 100% sebanyak tiga kali, xylene sebanyak dua kali dan paraffin masing-masing 0,5-1 jam. Jaringan dicetak dan dipotong dengan ketebalan 5-7 µm, dan kemudian ditaruh pada gelas objek.

Pewarnaan hematoxylin dan eosin dilakukan dengan cara memasukkan jaringan dalam xylene sebanyak tiga kali, masing-masing selama dua menit, kemudian dalam etanol 100% sebanyak dua kali, etanol 95% sebanyak dua kali masing-masing selama satu menit, kemudian direndam dalam hematoxylin selama 10 menit. Jaringan dicelupkan ke dalam akuades sebanyak empat kali celupan, acid alkohol 1% sebanyak 3-10 celupan, dan dibilas dengan air mengalir selama 15 menit. Jaringan diwarnai dengan eosin selama 3-5 menit, dibilas etanol 95% sebanyak dua kali, etanol 100% sebanyak dua kali masing-masing selama satu menit, xylene sebanyak tiga kali selama dua menit, kemudian ditutup dengan gelas penutup. Gelas preparat dikeringkan untuk selanjutnya dilakukan pemeriksaan di bawah mikroskop cahaya.

Analisis Data

Data hasil pengamatan kelangsungan hidup (*survival rate*) ikan, gejala klinis, dan pengamatan histopatologi pada organ eksternal dan internal ikan disajikan dalam bentuk tabel dan gambar. Selanjutnya data dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perubahan Klinis Eksternal

Selama 28 hari pemberian pakan probiotik tidak dijumpai ikan yang mati. Namun, setelah diuji tantang dengan *V. alginolyticus* didapatkan jumlah ikan yang hidup pada perlakuan kontrol lebih rendah daripada ikan yang diberi pakan

tanpa BAL (Tabel 1). Kelangsungan hidup ikan tertinggi dijumpai pada ikan yang diberi isolat KSBU 5Da (96,67±5,77%), dan terendah pada ikan kontrol (73,3±28,87%). Namun, secara statistika tidak terdapat perbedaan yang signifikan ($P>0,05$) antar perlakuan tersebut.

Tabel 1. Kelangsungan hidup ikan kerapu macan setelah diuji tantang dengan *Vibrio alginolyticus*

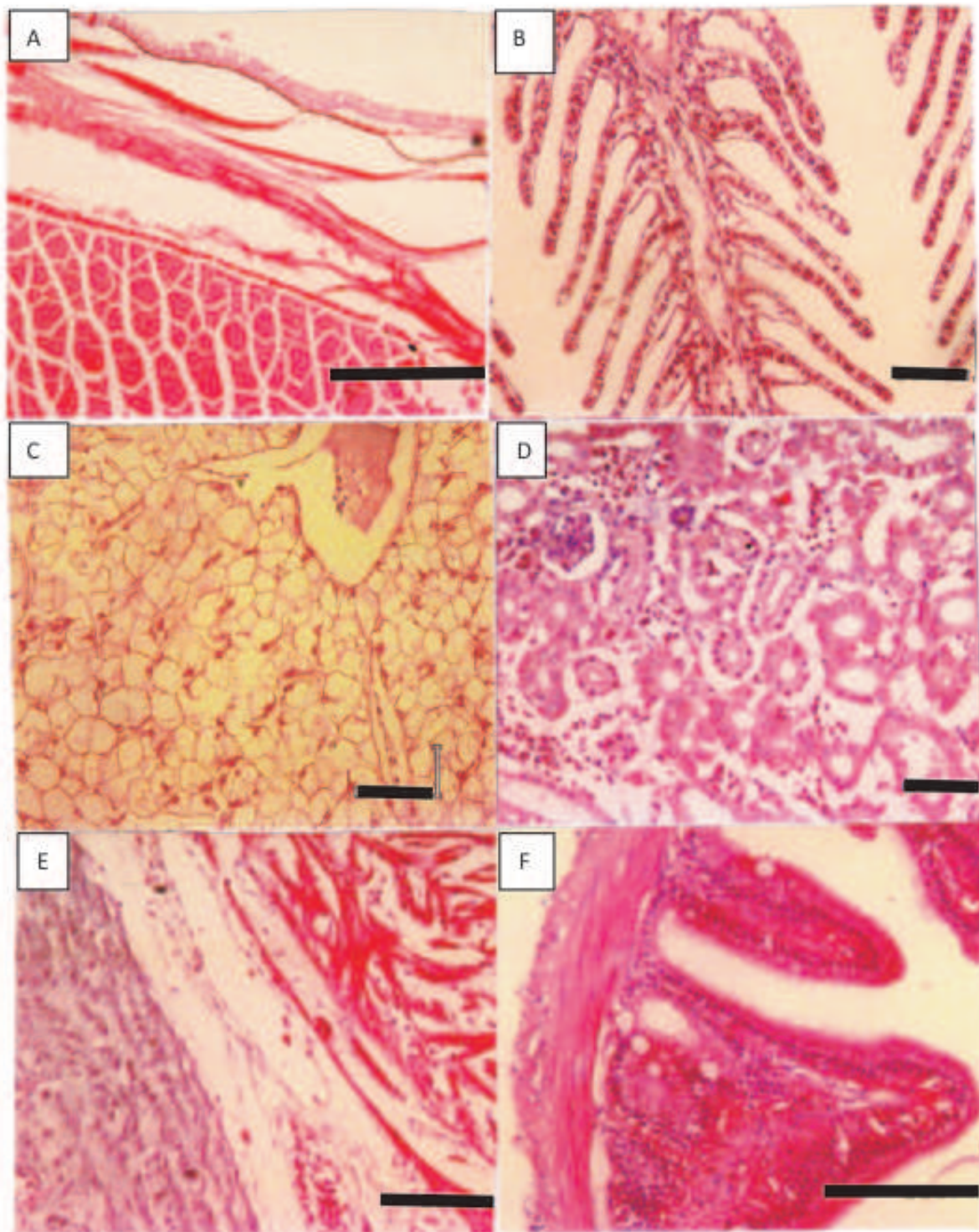
Perlakuan/isolat	Kelangsungan hidup (%)
Kontrol (K)	73,30±28,87
KSBU 12C (P1)	93,30±5,77
KSBU 5Da (P2)	96,67±5,77
KSBU 9 (P3)	90,00±10,00

Keterangan:

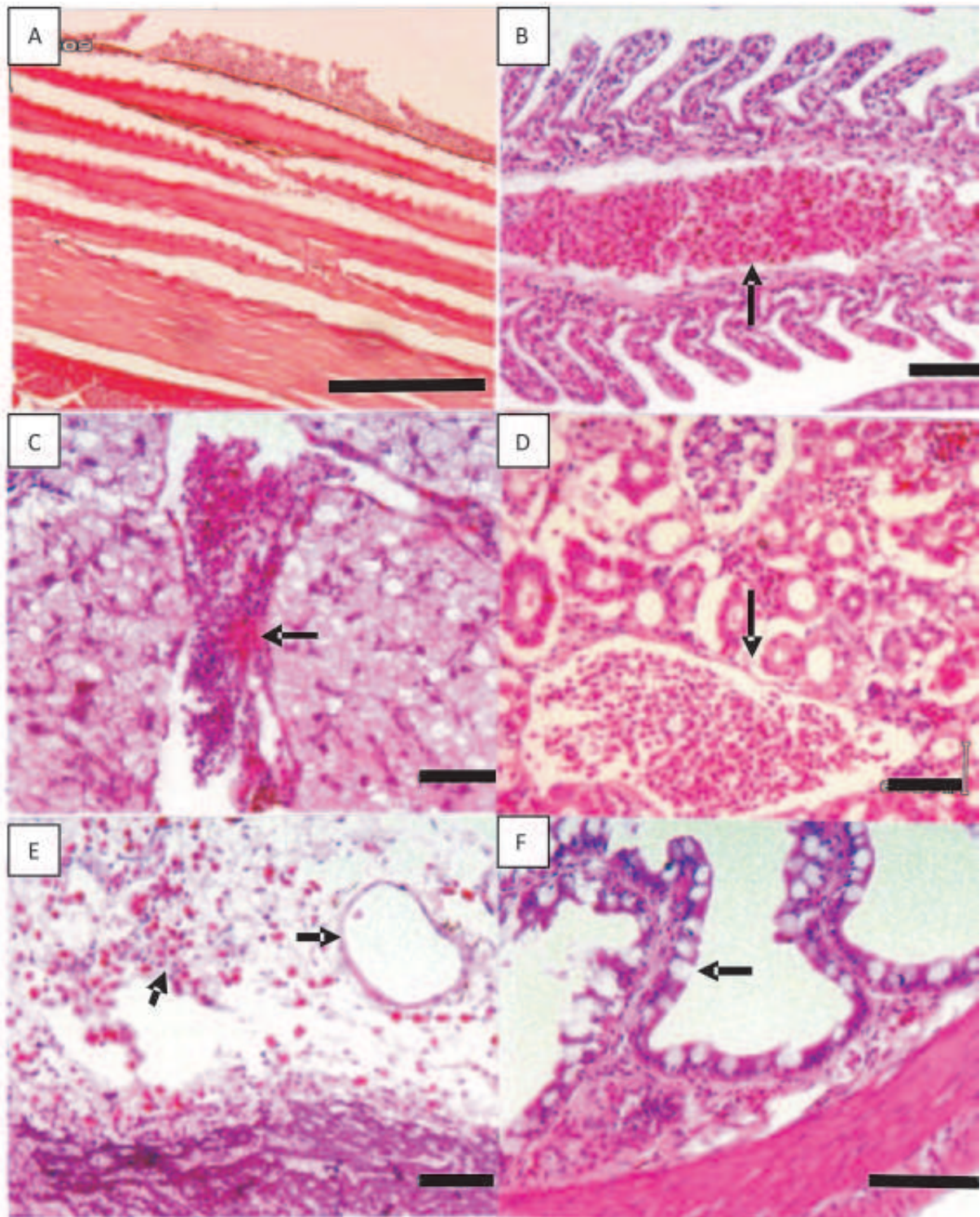
- KSBU 12C = Isolat BAL yang diisolasi dari ikan kerapu macan (K) dari Situbondo (SB) pada bagian usus (U); 12C, dari ikan ke-12
- KSBU 5DA = Isolat BAL yang diisolasi dari ikan kerapu macan (K) dari Situbondo (SB) pada bagian usus (U); 5DA, dari ikan ke-5
- KSBU 9 = Isolat BAL yang diisolasi dari ikan kerapu macan (K) dari Situbondo (SB) pada bagian usus (U); 9, dari ikan ke-5.

Pemberian BAL dapat meningkatkan kelangsungan hidup ikan kerapu macan. Penemuan ini tidak jauh berbeda dengan Swain *et al.* (2009) yang melaporkan bahwa sintasan larva udang *Penaeus monodon* lebih tinggi setelah diberi probiotik *Streptococcus phocae* P180 (92%) dan *Enterococcus faecium* MC13 (84%) setelah diuji tantang dengan *V. harveyi* dibanding kontrol (60%). Gopalakannan dan Arul (2011) mendapatkan sintasan yang lebih tinggi pada ikan mas yang diberi probiotik *E. faecium* MC13 selama 60 hari (78%) daripada 30 hari (75%) setelah diuji tantang dengan *A. hydrophila*.

Pengamatan terhadap ikan yang sakit pada semua perlakuan menunjukkan gejala-gejala seperti pergerakan lambat, berenang tidak teratur, diam di dasar akuarium, warna badan pucat, dan selera makan menurun. Pada sebagian ikan sakit dijumpai adanya hemoragi pada pangkal sirip perut dan sirip dada, anus berwarna merah dan borok pada bekas injeksi dan badan. Pada ikan yang mati dijumpai hati berwarna pucat, ginjal bengkak, usus rapuh, dan cairan berwarna kuning pada rongga perut. Gejala klinis yang sama juga dilaporkan terjadi



Gambar 1. Mikrograf organ ikan kerapu macan kelompok kontrol, tampak sehat dan normal. A. kulit, B. insang, C. hati, D. ginjal, E. jantung, F. usus. Skala bar 50 μm .



Gambar 2. Mikrograf organ ikan kerapu macan yang diberi isolat KSBU 12C sesudah uji tantang dengan *V. alginolyticus*. A. kulit normal, B. kongesti insang, C. kongesti hati, D. kongesti ginjal, E. kongesti dan radang jantung, F. peningkatan sel goblet usus. Skala bar 50 μ m.

pada ikan kerapu tikus yang terserang *V. alginolyticus* di BBAP Situbondo, Jawa Timur (Nitimulyo *et al.*, 2005), dan ikan kerapu macan yang diinfeksi dengan *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, dan *V. fuscus* (Sarjito *et al.*, 2007).

Pemeriksaan Histopatologi

Hasil pemeriksaan histopatologi ikan kerapu macan setelah diberi pakan yang disuplementasi dengan isolat BAL, dan diuji tantang dengan *V. alginolyticus* menunjukkan adanya perubahan pada organ insang, hati, ginjal, dan jantung dibandingkan dengan kondisi normal ikan (Gambar 1). Namun, pada usus ikan yang diberi pakan BAL terlihat adanya peningkatan sel goblet yang tidak dijumpai pada ikan yang diberi pakan kontrol.

Ikan yang diberi pakan dengan isolat BAL KSBU 12C, KSBU 5Da, dan KSBU 9 sesudah diinfeksi dengan *V. alginolyticus* menunjukkan perubahan yang hampir sama pada semua organ yang diamati. Pada ikan yang diberi KSBU 12C, kulit terlihat normal (Gambar 2A), kongesti insang (Gambar 2B), kongesti hati (Gambar 2C), kongesti ginjal (Gambar 2D), epikarditis/radang jantung (Gambar 2E), dan peningkatan sel goblet pada usus (Gambar 2F). Pada ikan yang diberi pakan dengan isolat KSBU 5Da perubahan yang terlihat adalah radang hati, kongesti ginjal, radang submukosa lambung, peningkatan sel goblet pada usus, radang granuloma lambung, dan epikarditis. Demikian pula ikan yang diberi pakan dengan isolat BAL KSBU 9 menunjukkan kongesti insang, degenerasi dan kongesti hati dan ginjal, epikarditis, dan peningkatan sel goblet pada mukosa usus.

Perubahan dan kerusakan organ yang hampir sama pada ikan yang diberi isolat BAL dapat disebabkan karena *V. alginolyticus* yang diinfeksi secara *intraperitoneal* (IP) menyebabkan penyebaran patogen ini melalui sirkulasi darah lebih cepat daripada proliferasi BAL pada usus yang diberikan melalui mulut. Penyebaran agen penyakit melalui sistem sirkulasi menimbulkan kerusakan endotel dinding pembuluh darah serta menyebabkan perubahan degeneratif organ-organ yang disuplainya. Jika kondisi degeneratif sel itu berlanjut, maka terjadi kematian sel yang kemudian menimbulkan radang pada lokasi tersebut (Agungpriyono *et al.*, 2004).

Bakteri *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, dan *V. salmonicida* digolongkan sebagai *Vibrio*

penyebab septikemia. Tanda-tanda klinisnya yaitu hemoragi pada kulit, insang dan ekor, borok pada kulit, hemoragi pada jaringan otot dan permukaan serosa. Limpa ikan yang terinfeksi mengalami pembengkakan dan berwarna merah cerah. Secara histologi, hati, ginjal, limpa, dan mukosa usus mengalami nekrosis (Irianto, 2005). Ikan yang terinfeksi *V. alginolyticus* mengalami kongesti hati, kongesti kapiler dinding usus, gelembung udara, dan peritoneum (Austin dan Austin, 2007).

Pada ginjal dan hati ikan yang diberi BAL dan setelah diinfeksi dengan *V. alginolyticus* terjadi kongesti. Martin *et al.* (2010) melaporkan bahwa kuda laut (*Hippocampus reidi*), yang terinfeksi *V. alginolyticus* menunjukkan infiltrasi leukosit dan nekrosis pada ginjal, hiperplasia, deformasi sinusoidal, dan nekrosis pada hati. Ini dapat disebabkan karena *V. alginolyticus* mampu menghasilkan toksin sebagai serum protease (Lee *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1999), yang bertanggungjawab terhadap perubahan pada insang, ginjal, dan hati ikan yang terinfeksi.

Namun demikian, pada usus ikan yang diberi masing-masing isolat BAL terlihat adanya peningkatan jumlah sel goblet. Sel goblet merupakan bagian dari lapisan mukosa usus yang berfungsi memproduksi mukus yang membantu memerangkap bakteri yang masuk ke dalam usus. Hasil penelitian ini sejalan dengan laporan Harper *et al.* (2011) bahwa pemberian *Pediococcus acidilactici* menstimulasi pembentukan sel goblet pada mukosa usus dan meningkatkan sekresi mukus. Cerezuela *et al.* (2013) juga melaporkan bahwa pemberian *B. subtilis* (10^7 CFU g^{-1}), atau *B. subtilis* + inulin (10^7 CFU g^{-1} +10 g kg^{-1}) melalui pakan pada *gilthead sea bream* (*Sparus aurata* L.) selama empat minggu menyebabkan kerusakan pada usus berupa edema dan inflamasi.

Namun, penemuan ini berbeda dari hasil penelitian Ringo *et al.* (2007), yang melaporkan bahwa bakteri probiotik *Carnobacterium divergens*, pada konsentrasi 6×10^4 atau 6×10^6 CFU/mL tidak menimbulkan perubahan histologi pada epitel usus ikan salmon atlantik (*Salmo salar* L.), dan bakteri tersebut mampu mencegah kerusakan yang diinduksi oleh patogen (*A. salmonicida* dan *V. anguillarum*). Sementara itu, Marzouk *et al.* (2008) mendapatkan ikan nila yang disuplementasi sel mati *Saccharomyces cereviceae* dan sel hidup *B. subtilis*

menunjukkan aktivasi yang besar dari pusat melano-makrofag dan sel Kupffer pada limpa dan hati. Berdasarkan hasil penemuan-penemuan ini, dapat diketahui bahwa pemilihan jenis dan pemberian probiotik pada konsentrasi yang lebih tinggi diperkirakan dapat menghindari kerusakan pada berbagai organ ikan.

SIMPULAN

Hasil pengamatan histopatologi pada ikan kerapu macan yang disuplementasi masing-masing dengan tiga isolat BAL diikuti infeksi dengan *V. alginolyticus* menunjukkan terjadinya perubahan pada organ dalam yaitu terjadinya kongesti pada insang, hati, dan ginjal, di samping epikarditis. Namun demikian, pemberian BAL sebagai probiotik meningkatkan pembentukan sel goblet yang berfungsi mensekresi mukus pada usus ikan.

SARAN

Untuk meminimalkan efek vibriosis pada ikan kerapu macan, pemberian probiotik dalam jumlah yang cukup harus dipertimbangkan, sehingga dapat menekan pertumbuhan bakteri patogen, khususnya *V. alginolyticus*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih Kepala BBPBAP Jepara dan Kepala Laboratorium Patologi FKH UGM yang telah mengizinkan penggunaan fasilitas laboratorium, dan Wahyu Ilahi yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Agungpriyono DR, Huminto H, Harkin, Handharyani E, Pasaribu FH. 2004. Perubahan jaringan akibat infeksi herpes virus atau herpes-like virus pada ikan mas (*Cyprinus carpio* L.) dan koi (*C. carpio* Koi). *Prosiding Pengendalian Penyakit pada Ikan dan Udang*, IV. Purwokerto. Hlm. 117-120.

- Al-Dohail AM, Hashim R, Aliyu-Paiko M. 2009. Effects of the probiotic, *Lactobacillus acidophilus*, on the growth performance, haematology parameters and immunoglobulin concentration in African catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822) fingerling. *Aquacult Res* 40: 1642-1652.
- Aly, SM, Ahmed YAG, Ghareeb AAA, Mohamed MF. 2008. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish & Shellfish Immunology* 25: 128-136.
- Austin B, Austin DA. 2007. *Bacterial Fish Pathogens: Diseases of farmed and wild fish*. 4th ed. Chichester, UK. Springer-Praxis Publishing. Hlm. 40-41.
- Cerezuela R, Fumanal M, Tapia-Taniagu ST, Meseguer J, Morinigi MA, Esteban MA. 2013. Changes in intestinal morphology and microbiota caused by dietary administration of inulin and *Bacillus subtilis* in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) specimens. *Fish and Shellfish Immunology* 34: 1063-1070.
- Chabrillon M, Arijio S, Diaz-Rosales P, Balebonz MC, Morinigo MA. 2006. Interference of *Listonella anguillarum* with potential probiotic microorganisms isolated farmed gilt-head sea bream (*Sparus auratus*, L.). *Aquaculture Research* 37: 78-86.
- Chen, FR, Liu, PC, Lee, KK. 1999. Purification and partial characterization of a toxic serine protease produced by pathogenic *Vibrio alginolyticus*. *Microbios* 98 (390): 95-111.
- Darjono, Tabbu CR, Kurniasih, Wasito R, Sutrisno R. 2001. *Petunjuk Praktikum Patologi Umum*. Jogjakarta. Lab Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada.
- El-Dakar AY, Shalaby SM, Saoud IP. 2007. Assessing the use of dietary probiotic/prebiotic as an enhancer of spinefoot rabbitfish *Siganus rivulatus* survival and growth. *Aquac Nutr* 13: 407-412.
- El-Ezabi MM, El-Serafy SS, Essa MM, Lall S, Daboor SM, Esmael NA. 2011. The viability of probiotics as a factor influencing the immune response in the Nila tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Egypt J Aquat Biol & Fish* 15(1): 105-124.

- Gopalakannan A, Arul V. 2011. Inhibitory activity of probiotic *Enterococcus faecium* MC13 against *Aeromonas hydrophila* confers protection against hemorrhagic septicemia in common carp *Cyprinus carpio*. *Aquaculture International* 19: 973-985.
- Harper GM, Saoud IP, Emery M, Mustafa S, Rawling M, Eynon B, Davies SJ, Merrifield DL, Monfort M. 2011. An ex vivo approach to studying the interactions of probiotic *Pediococcus acidilactici* and *Vibrio (Listonella) anguillarum* in the anterior intestine of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Aquac Res Development*. Special Issue 1. 6 pages.
- Irianto A. 2005. *Patologi Ikan Teleostei*. Yogyakarta. Gadjah Mada University Press. Hlm. 148-149.
- Lee KK, Yu SR, Liu PC. 1997. Alkaline serine protease is an exotoxin of *Vibrio alginolyticus* in kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Current Microbiology* 34 (2): 110-117.
- Martins ML, Mouriño JLP, Fezer GF, Buglione Neto CC, Garcia P, Silva BC, Jatobá A, Vieira FN. 2010. Isolation and experimental infection with *Vibrio alginolyticus* in the sea horse, *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933 (Osteichthyes: Syngnathidae) in Brazil. *Braz J Biol* 70 (1): 205-209
- Marzouk MS, Moustafa MM, Mohamed NM. 2008. Evaluation of immunomodulatory effects of some probiotics on cultured *Oreochromis niloticus*. 8th International Symposium on *Tilapia in Aquaculture*. Hlm. 1043-1058.
- Nayak SK. 2010. Probiotics and immunity: A fish prespective. Review. *Fish and Shellfish Immunology* 29: 2-14.
- Nitimulyo KH, Isnansetyo A, Triyanto, Istiqomah I, Murdjani M. 2005. Isolasi, identifikasi dan karakterisasi *Vibrio* spp. Patogen penyebab vibriosis pada kerapu di Balai Budidaya Air Payau Situbondo. *Jurnal Perikanan* 7 (2): 80-94.
- Nursyirwani, Asmara W, Wahyuni AETH, Triyanto. 2011. Isolasi bakteri asam laktat dari usus ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) dan potensinya sebagai antivibrio. *Ilmu Kelautan* 16(2): 70-77.
- Nursyirwani, Asmara W, Wahyuni AETH, Triyanto. 2013. Supplementation of Lactic Acid Bacteria in Feed Induced Non-Specific Immune Response of Tiger Grouper. *JVeteriner* 14(3): 270-278.
- Ringo E, Salinas I, Olsen RE, Nyhaug A, Myklebust R, Mayhew TM. 2007. Histological changes in intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) following in vitro exposure to pathogenic and probiotic bacterial strains. *Cell Tissue Research*, 328: 109-116.
- Saenz de Rodriguez MA, Diaz-Rosales P, Chabrillon M, Smidt H, Arijo S, Leon-Rubio JM. 2009. Effect of dietary administration of probiotics and intestine functionally of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). *Aquac Nutr* 15: 177-185.
- Sarjito, Radjasa OK, Hutabarat S. Prayitno SB. 2007. Causative agents vibriosis dari ikan kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*): Patogenesis pada ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*). *Ilmu Kelautan* 12(3): 173-180.
- Son VM, Chang CC, Wu MC, Guu YK, Chiu CH, Cheng W. 2009. Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*. *Fish Shellfish Immunol* 26: 691-698.
- Sugita H, Hirose Y, Matsuo N, Deguchi Y. 1998. Production of the antibacterial substance by *Bacillus* sp. strain NM 12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. *Aquaculture* 165: 269-280.
- Swain SM, Singh C, Arul V. 2009. Inhibitory activity of probiotics *Streptococcus phocae* PI80 and *Enterococcus faecium* MC13 against vibriosis in shrimp *Penaeus monodon*. *World Journal of Microbiology Biotechnology* 25: 697-703.
- Vine NG, Leukes WD, Kaiser H, Daya S, Baxter J, Hecht T. 2004. Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *Journal of Fish Diseases* 27: 319-326.
- Yan I, Boyd KG, Burgess JG. 2002. Surface attachment induced production of antibacterial compounds by marine epiphytic bacteria using modified roller bottle cultivation. *Mar Biotechnol* 4: 356-366.