

## Aktivitas Antagonis *Bacillus subtilis* terhadap *Streptococcus iniae* dan *Pseudomonas fluorescens*

(ANTAGONIST ACTIVITY OF *BACILLUS SUBTILIS* AGAINST *STREPTOCOCCUS INIAE* AND *PSEUDOMONAS FLUORESCENS*)

Budianto<sup>1</sup>, Heny Suprastyani<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Budidaya Perairan,  
Jurusan Manajemen Sumberdaya Perairan

<sup>2</sup>Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan  
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya,  
Jl. Veteran, Malang, Jawa Timur, Indonesia 65145  
Telp. 0341-553512; Email: [budianto.bp@ub.ac.id](mailto:budianto.bp@ub.ac.id)

### ABSTRAK

Intensifikasi budidaya ikan telah menyebabkan berbagai dampak, seperti penyakit pada ikan. Salah satunya adalah penyakit bakteriawi. Penggunaan bakteri probiotik sebagai agen antimikrob yang aman dan efektif adalah salah satu strategi untuk menanggulangi penyakit tersebut. *Bacillus subtilis* merupakan bakteri probiotik yang dapat memproduksi senyawa bakteriosin dan memiliki efek antagonis terhadap bakteri Gram negatif dan positif. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengevaluasi aktivitas antagonis dari *B. subtilis* terhadap *Streptococcus iniae* dan *Pseudomonas fluorescens*. Uji aktivitas antagonis dilakukan dengan menggunakan difusi cakram kertas terhadap bakteri uji. Variasi perlakuan pada uji cakram kertas adalah menggunakan perbedaan waktu inkubasi *B. subtilis*, yaitu waktu inkubasi 0, 6, 12, 18, 24 dan 30 jam. Berdasarkan hasil penelitian, *B. subtilis* (waktu generasi=30,62 menit) dapat memproduksi senyawa antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji. Aktivitas antagonis terdeteksi pada awal fase eksponensial yaitu inkubasi enam jam, dengan diameter zona hambat sebesar  $7,28 \pm 0,18$  mm (*S. iniae*) dan  $6,75 \pm 0,11$  mm (*P. fluorescens*) dan mencapai optimum pada awal fase stasioner yaitu inkubasi 24 jam, dengan diameter zona hambat sebesar  $8,84 \pm 0,28$  mm (*S. iniae*) dan  $9,14 \pm 0,91$  mm (*P. fluorescens*). Dapat disimpulkan bahwa *B. subtilis* dapat berperan dalam pengendalian penyebaran penyakit bakteri pada budidaya ikan, khususnya yang disebabkan oleh *S. iniae* dan *P. fluorescens*.

Kata-kata kunci: *Bacillus subtilis*; *Streptococcus iniae*; *Pseudomonas fluorescens*; difusi cakram kertas

### ABSTRACT

Intensification of fish farming has caused various impacts, for example diseases in fish. One of the diseases in fish is a bacterial disease. The use of probiotic bacteria as an antimicrobial agent, which is relatively safe and effective, is a strategy to treat the disease. *Bacillus subtilis* is probiotic bacteria which can produce bacteriocin compounds and has antagonistic effects against both Gram negative and Gram positive bacteria. The aim of this study was to evaluate the antagonist activity of *B. subtilis* against *Streptococcus iniae* and *Pseudomonas fluorescens*. Antagonist activity test was done by using paper disc diffusion against the bacteria. The variations on the test paper disc method used were based on the difference of *B. subtilis* incubation time, such as: 0, 6, 12, 18, 24 and 30 hours. The results showed *B. subtilis* (generation time = 30.62 min) produced antibacterial compounds which inhibited the growth of the bacteria. Antagonist activity was detected in early exponential phase, six hours, with inhibition zone diameter of  $7.28 \pm 0.18$  mm (*S. iniae*) and  $6.75 \pm 0.11$  mm (*P. fluorescens*) and reached optimum at early stationary phase, 24 hours, the inhibition zone diameter of  $8.84 \pm 0.28$  mm (*S. iniae*) and  $9.14 \pm 0.91$  mm (*P. fluorescens*). It can be concluded that *B. subtilis* can contribute in controlling the spread of bacterial diseases in fish farming, particularly caused by *S. iniae* and *P. fluorescens*.

Keywords: *Bacillus subtilis*; *Streptococcus iniae*; *Pseudomonas fluorescens*; and paper disc diffusion

## PENDAHULUAN

Intensifikasi budidaya ikan telah menyebabkan berbagai macam penyakit yang berdampak pada menurunnya produksi (Shoemaker *et al.*, 2006). Salah satu penyakit yang sering menyerang ikan budidaya adalah penyakit bakterial. Pada budidaya ikan secara intensif, ikan sering mengalami kondisi stres, mendorong penyakit bakteri terjadi, dan mengakibatkan kerugian ekonomi yang serius. Bakteri patogen yang sering menyerang ikan air tawar adalah bakteri *Streptococcus iniae* dan *Pseudomonas fluorescens*. Bakteri tersebut dapat menyebabkan pembengkakan dan kerusakan pada hati, ginjal dan limpa pada ikan dan juga menyebabkan kematian massal pada semua spesies ikan air tawar pada berbagai tahapan pertumbuhan. Beberapa penelitian telah melaporkan bahwa bakteri patogen dapat menginfeksi ke dalam tubuh ikan melalui insang dan kulit yang terluka dan dapat menimbulkan gejala penyakit seperti pembengkakan pada kulit, pembengkakan perut, luka kemerahan, nekrosis, borok/luka, dan *septicemia* (Post, 1987; Austin dan Austin, 2007). Selain itu, gejala klinis dari infeksi *S. iniae* adalah ikan mengalami lemah lesu, luka di badan, *exophthalmia*, dan puncaknya terjadi meningoensefalitis yang parah. Penyakit bakteri tersebut ditemukan telah menyerang di tiga wilayah yang berbeda di dunia, antara lain: Amerika Utara, Timur Tengah, dan Asia-Pasifik (Agnew dan Barnes, 2007).

Dampak dari penggunaan agen antibakteri di seluruh dunia untuk tujuan profilaksis dan terapi telah menyebabkan peningkatan resistensi bakteri. Bakteri patogen sering mengembangkan resistensi terhadap obat, jika terpapar obat antibakteri jangka panjang dan hal tersebut mengakibatkan infeksi yang lebih sulit untuk diobati (Sugita *et al.*, 2002, Sarter *et al.*, 2007). Sehingga, metode alternatif dibutuhkan untuk mengontrol bakteri patogen pada sistem budidaya ikan. Strategi yang dapat dilakukan adalah memanfaatkan bakteri probiotik sebagai agen kontrol biologi untuk penyakit ikan. Salah satu bakteri probiotik yang dapat mengendalikan penyakit bakteri adalah *Bacillus subtilis* (Das *et al.*, 2014).

Bakteri *B. subtilis* telah banyak digunakan sebagai probiotik oral (Green *et al.*, 1999) dan merupakan bakteri Gram positif, non patogen, membentuk spora, serta umumnya digunakan sebagai organisme antidiare (Mazza, 1994).

Menurut Das *et al.* (2014), *B. subtilis* memiliki efek antagonistik terhadap bakteri Gram negatif (*Aeromonas hydrophila*, *P. aeruginosa*, *Edwardsiella tarda*, *Vibrio parahaemolyticus* dan *Flavobacterium columnare*) dan bakteri Gram positif (*Staphylococcus aureus*). Selain itu, Nagarajan *et al.* (2014) juga melaporkan bahwa *B. subtilis* dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen pada ikan air laut yakni *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* dan *V. harveyi*. Genus *Bacillus* memiliki senyawa bakteriosin yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri lain (Oscariz *et al.*, 1999, Ahern *et al.*, 2003, dan Gillor *et al.*, 2008).

Pada penelitian ini bakteri *B. subtilis* dimanfaatkan sebagai mikroorganisme antibakteri untuk dapat dikembangkan sebagai agen alternatif untuk mengendalikan penyakit pada budidaya ikan. Saat ini, sedikit informasi tersedia tentang *B. subtilis* untuk pengobatan ikan, khususnya terhadap penyakit bakteri oleh *S. iniae* dan *P. fluorescens*. Oleh karena itu, tujuan dari penelitian ini dirancang bertujuan untuk mengevaluasi aktivitas antagonis bakteri *B. subtilis* terhadap bakteri *S. iniae* dan *P. fluorescens*.

## METODE PENELITIAN

### Kultur Bakteri dan Produksi Senyawa Antibakteri

**Peremajaan *Bacillus subtilis* dan Bakteri Uji.** Isolat bakteri *B. subtilis* dan bakteri uji (*S. iniae* dan *P. fluorescens*) yang digunakan pada penelitian ini merupakan isolat simpanan dalam media cair *Nutrient Broth/NB* (Merck, Germany) yang diperoleh dari Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan (FPIK), Universitas Brawijaya, Malang. Isolat diremajakan dengan cara menginokulasikan masing-masing bakteri pada media *Trypticase Soy Agar/TSA* (Merck, Germany) dalam cawan petri yang berbeda, kemudian diinkubasi pada suhu 32°C selama 24 jam.

**Pembuatan Stok Kultur Bakteri.** Isolat bakteri *B. subtilis* diinokulasikan ke dalam 10 mL media NB kemudian diinkubasi pada suhu 32°C selama 24 jam. Pembuatan kultur juga dilakukan pada bakteri uji ke dalam media yang sama. Hasil stok masing-masing bakteri disimpan dalam *refrigerator* (suhu 6-8°C).

**Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri *B. subtilis*.** Sebanyak 10 µL Bakteri

*B. subtilis* yang diambil dari stok, diinokulasi pada 10 mL media NB dalam 17 tabung reaksi dan diinkubasi pada suhu 32°C. Pertumbuhan bakteri diamati setiap tiga jam (selama 48 jam). Konsentrasi sel ditentukan dengan mengukur kekeruhan cairan melalui pengukuran nilai *optical density* (OD) menggunakan spektrofotometer UV-VIS dengan panjang gelombang 600 nm (Vine *et al.*, 2004). Peningkatan konsentrasi sel ( $dx$ ) adalah sebanding dengan jumlah ( $x$ ) dan pada interval waktu ( $dt$ ). Laju pertumbuhan spesifik ( $i$ ) dihitung dari persamaan berikut:  $i = (\ln(x_2) - \ln(x_1)) \times (t_2 - t_1)^{-1}$

Dalam persamaan tersebut,  $i$  merupakan laju pertumbuhan per jumlah unit dari konsentrasi sel,  $x_1$  dan  $x_2$  = konsentrasi sel pada masing-masing waktu ke-1 ( $t_1$ ) dan waktu ke-2 ( $t_2$ ).

*Doubling time* ( $t_d$ ) merupakan waktu generasi dari biomassa. *Doubling time* (jam) dari laju pertumbuhan dihitung berdasarkan persamaan:  $t_d = \ln 2 \times i^{-1} = 0,693 \times i^{-1}$

**Produksi Senyawa Antibakteri.** Produksi Senyawa Antibakteri dari Bakteri *B. subtilis* diukur menggunakan metode Ansari *et al.* (2012) dengan sedikit modifikasi. Inokulum bakteri sebanyak 10  $\mu$ L ditumbuhkan dalam 10 mL media NB pada suhu 32°C, selama 0, 6, 12, 18, 24, dan 30 jam. Setelah diinkubasi pada periode tersebut, bakteri dipanen dengan cara disentrifugasi dengan kecepatan 6.000 rpm selama 15 menit. Supernatan bebas sel yang diperoleh kemudian disaring menggunakan mikrofilter 0,22  $\mu$ m dan disimpan dalam refrigerator (suhu 6-8°C) untuk selanjutnya digunakan dalam uji aktivitas antibakteri.

#### Uji Aktivitas Antibakteri oleh *B. subtilis*

Uji Aktivitas Antibakteri oleh *B. subtilis* menggunakan metode difusi cakram kertas menurut Sansawat dan Thirabunyanon (2009) dengan modifikasi. Setiap cakram kertas steril berdiameter 6 mm (Oxoid, UK) direndam dalam 20  $\mu$ L supernatan *B. subtilis* (sesuai dengan periode pertumbuhan 0, 6, 12, 18, 24, dan 30 jam). Cakram kertas tersebut kemudian diletakkan pada media *Muller-Hinton Agar/MHA* (Oxoid, UK) yang sebelumnya diinokulasi dengan bakteri uji (*S. iniae* dan *P. fluorescens*) dengan kepadatan  $10^7$  cfu/mL. Media agar diinkubasi pada suhu 32°C, selama 24 jam. Selanjutnya, zona hambatan (mm) yang terlihat di sekitar cakram kertas diukur menggunakan *digital caliper* (Krisbow, KW06-351). Setiap perlakuan dilakukan dengan tiga kali ulangan.

#### Analisa Data

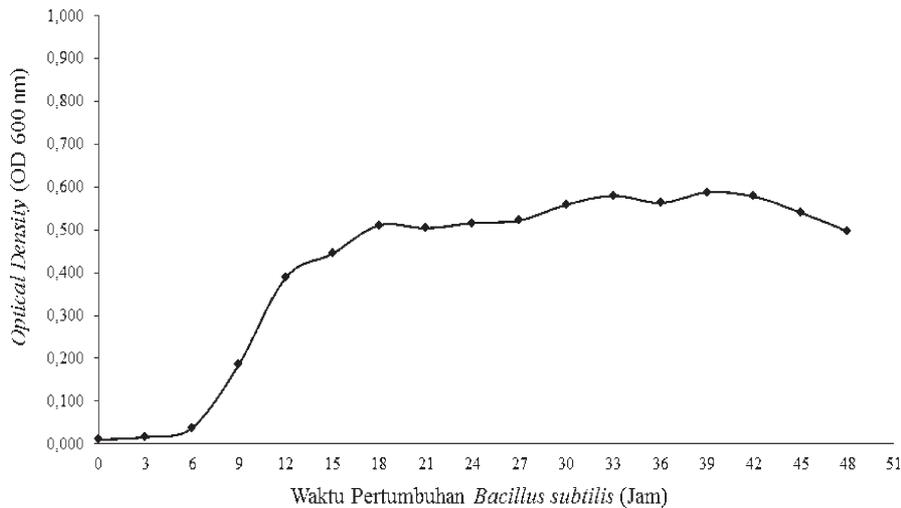
Analisis data dilakukan dengan menggunakan *Univariate Analysis of Variance* dengan menggunakan *software Statistical Package for Social Sciences/SPSS* versi 20.0 for *Windows*.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### Kurva Pertumbuhan Bakteri *B. subtilis*

Pada penelitian ini dilakukan pengukuran nilai OD setiap tiga jam dengan panjang gelombang 600 nm dari kultur bakteri *B. subtilis* untuk mengetahui pertumbuhannya selama 48 jam. Pertumbuhan bakteri *B. subtilis* mengalami peningkatan dengan meningkatnya nilai OD, semakin keruh suspensi bakteri maka semakin tinggi konsentrasi bakteri yang tumbuh. Kurva pertumbuhan bakteri *B. subtilis* disajikan pada Gambar 1.

Kurva pertumbuhan *B. subtilis* diawali dengan fase *lag* (fase adaptasi), fase *lag* pada bakteri *B. subtilis* terjadi pada jam ke-0 hingga jam ke-6. Fase *lag* merupakan periode dari sel mikrob yang mengalami penurunan metabolit dan enzim sebagai akibat dari kondisi yang tidak menguntungkan pada media kultur sebelumnya, dan beradaptasi dengan lingkungan yang baru (Brooks *et al.*, 2007). Pada fase tersebut peningkatan jumlah sel bakteri berlangsung lambat. Setelah fase *lag* selesai, pertumbuhan bakteri berlangsung sangat cepat (fase eksponensial). Menurut Willey *et al.* (2011), fase eksponensial (log) merupakan fase dalam kurva pertumbuhan selama populasi mikrob tumbuh pada tingkat yang konstan dan maksimum, membagi dan menggandakan secara berkala. Pada penelitian ini, fase eksponensial dimulai pada jam ke-6 hingga jam ke-18. Bakteri memperbanyak diri dengan cara membelah menjadi dua. Masing-masing sel membelah lagi menjadi dua sehingga pada setiap generasi jumlahnya menjadi dua kali populasi sebelumnya. Selanjutnya, pada suatu laju pertumbuhan mencapai titik maksimal (fase stasioner, 18-48 jam). Waktu yang dibutuhkan untuk terjadinya proses pembelahan tersebut disebut dengan waktu generasi (Fardiaz, 1992). Waktu generasi adalah selang waktu yang dibutuhkan bagi sel untuk membelah diri atau untuk meningkatkan populasinya menjadi dua kali lipat (Pelczar *et al.*, 1998). Pada penelitian ini, *B. subtilis* memiliki waktu generasi 0,51 jam



Gambar 1. Kurva pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* yang diukur selama 48 jam.

atau 30,62 menit. Hasil ini sesuai dengan hasil penelitian dari Hageman *et al.* (1984) yang menunjukkan waktu generasi dari *B. subtilis* adalah sekitar 40 menit. Juga, Prihatiningsih *et al.* (2014) menyatakan bahwa waktu generasi bakteri *B. subtilis* adalah 32,62 hingga 33,84 menit. Waktu generasi digunakan untuk mengetahui karakteristik pertumbuhan suatu bakteri (Vine *et al.*, 2004). Selain itu, Vine *et al.* (2004) menambahkan asumsi bahwa bakteri probiotik lebih kompetitif terhadap bakteri patogen jika memiliki waktu generasi yang cepat. Berdasarkan hal tersebut, diharapkan bakteri *B. subtilis* dapat melawan bakteri *S. iniae* dan *P. fluorescens*.

**Aktivitas Antibakteri *B. subtilis***

Bakteri *B. subtilis* memiliki senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. iniae* dan *P. fluorescens*. Adanya aktivitas penghambatan ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambat di sekitar kertas cakram yang kemudian dihitung besarnya zona hambat. Hasil uji dari aktivitas antimikrob menggunakan metode cakram disajikan pada Tabel 1.

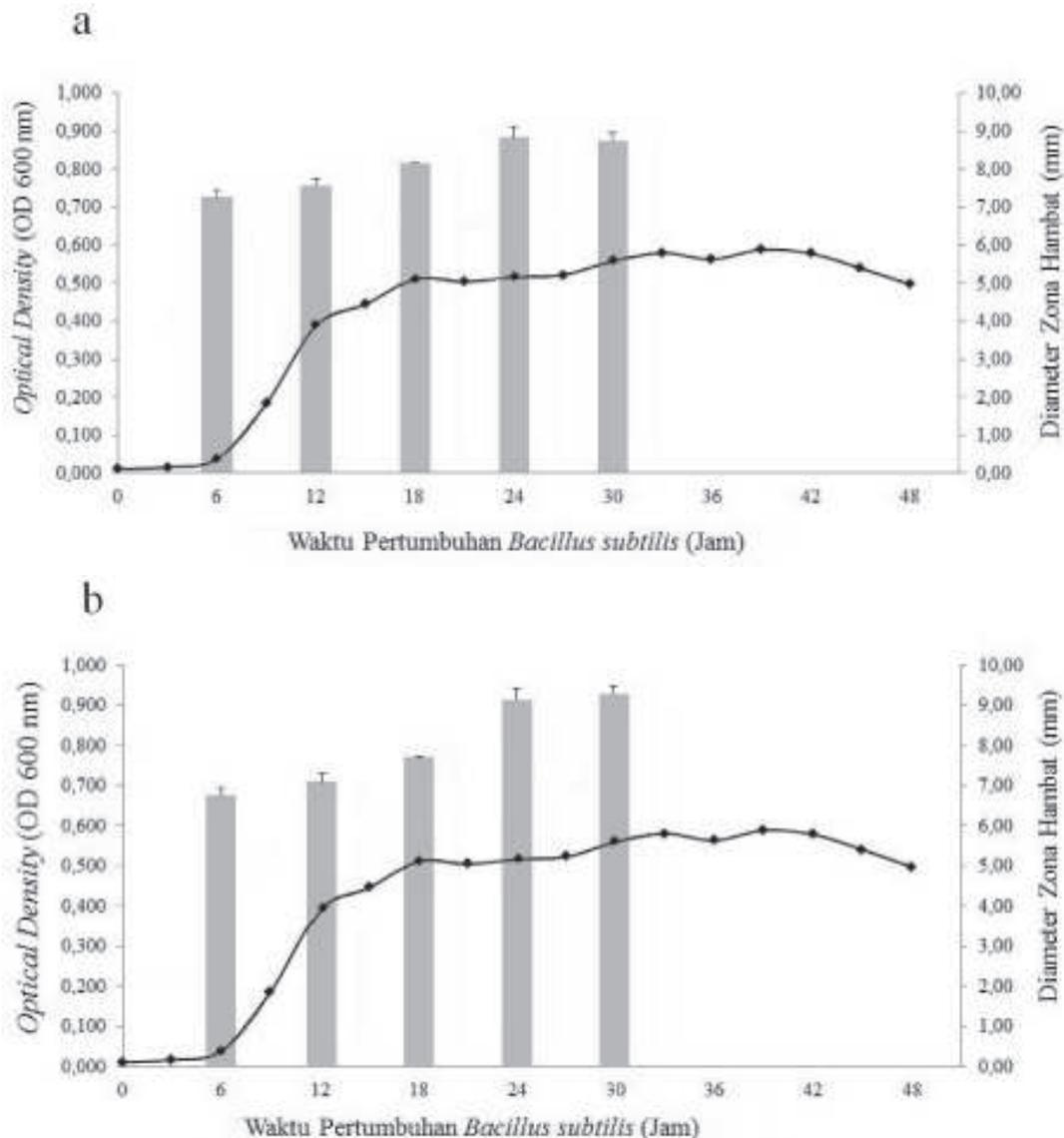
Plot nilai OD<sub>600</sub> dan diameter zona hambat (Gambar 2) terhadap waktu inkubasi menunjukkan peningkatan produksi senyawa antibakteri selama pertumbuhan *B. subtilis* (0, 6, 12, 18, 24 dan 30 jam). Pengujian aktivitas antibakteri supernatan *B. subtilis* menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri dimulai pada inkubasi enam jam, yakni pada awal fase eksponensial dengan nilai diameter zona hambat sebesar 7,28 ± 0,18 mm dan 6,75 ± 0,11 mm (masing-masing untuk *S. iniae* dan *P. fluo-*

*rescens*). Selanjutnya, diameter zona hambat terus meningkat hingga jam ke-30 (fase stasioner), dengan nilai diameter zona hambat sebesar 8,76 ± 0,19 mm dan 9,29 ± 1,65 mm (masing-masing untuk *S. iniae* dan *P. fluorescens*).

Adanya aktivitas antibakteri pada *B. subtilis* terhadap bakteri uji disebabkan oleh genus *Bacillus* memiliki senyawa bakteriosin dengan karakter yang spesifik. Menurut Oscariz *et al.* (1999), *B. cereus* menghasilkan bakteriosin dengan jenis *cerein* yang aktif melawan semua bakteri Gram positif dan beberapa Gram negatif, dan Ahern *et al.* (2003) melaporkan bahwa bakteriosin berupa *thuricin* dihasilkan oleh *B. thuringiensis*, sedangkan untuk *B. subtilis*, bakteri ini menghasilkan bakteriosin dengan jenis *bacillocin 22* (Gillor *et al.*, 2008). Chavan dan Riley (2007) menambahkan bahwa bakteriosin merupakan protein atau polipeptida

Tabel 1. Aktivitas antibakteri *Bacillus subtilis* terhadap bakteri *Streptococcus iniae* dan *Pseudomonas fluorescens*

Waktu Inkubasi	Diameter Zona Hambat (mm)	
	<i>S. iniae</i>	<i>P. fluorescens</i>
0 jam	0,00	0,00
6 jam	7,28 ± 0,18	6,75 ± 0,11
12 jam	7,57 ± 0,19	7,09 ± 0,10
18 jam	8,16 ± 0,03	7,71 ± 0,08
24 jam	8,84 ± 0,28	9,14 ± 0,91
30 jam	8,76 ± 0,19	9,29 ± 1,65



Gambar 2. Aktivitas antagonis bakteri *Bacillus subtilis* terhadap bakteri (a) *Streptococcus iniae* dan (b) *Pseudomonas fluorescens* (■ = Diameter Zona hambatan yang terbentuk pada *S. iniae* dan *P. fluorescens* (mm), ◆ = Pertumbuhan *B. subtilis* (OD 600 nm))

pendek yang mengandung gen toksin, gen imunitas dan gen lisis sehingga mampu mengikat dan kemudian membunuh sel-sel yang permukaan reseptornya dikenali oleh bakteriosin. Menurut Riley dan Wertz (2002) bakteriosin berbeda dengan antibiotik. Bakteriosin hanya bersifat toksik pada bakteri yang memiliki kekerabatan dekat dengan bakteri penghasil bakteriosin.

Pada penelitian ini, peningkatan waktu inkubasi menyebabkan aktivitas bakteriosin mengalami peningkatan pula dan mencapai optimum pada fase stasioner. Selain itu, hasil uji statistika menunjukkan bahwa pada waktu

inkubasi 24 dan 30 jam berbeda tidak nyata, sehingga dapat disimpulkan bahwa waktu inkubasi optimum adalah 24 jam. Hasil ini sesuai dengan hasil yang dilaporkan Ansari *et al.* (2012), bahwa produksi bakteriosin dari *B. subtilis* KIBGE IB-17 dimulai pada awal inkubasi enam jam, dan produksi maksimum dapat tercapai ketika bakteri berada pada fase eksponensial menuju ke fase stasioner (fase diam). Sementara itu, Ogunbanwo *et al.* (2003) menyatakan bahwa meningkatnya jumlah sel menyebabkan jumlah bakteriosin yang dihasilkan meningkat kemudian turun setelah mencapai fase stasioner. Xie *et al.* (2009) juga

menyatakan bahwa aktivitas antibakteri dapat dideteksi pada pertumbuhan pertengahan fase log (eksponensial) dan cepat mencapai maksimum pada fase awal stasioner. Waktu inkubasi berperan penting dalam produksi bakteriosin dan setelah 24 jam, tingkat produksi spesifik maksimum akan tercapai (Ansari *et al.*, 2012).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa *P. fluorescens* lebih sensitif daripada *S. iniae* terhadap bakteriosin *B. subtilis*, hasil ini dapat dilihat dari kemampuan hambat supernatan bakteriosin pada inkubasi 24 dan 30 jam yang menunjukkan zona hambat yang lebih besar dari pada *S. iniae*. Hal tersebut disebabkan oleh perbedaan sensitivitas antara bakteri Gram negatif (*P. fluorescens*) dan bakteri Gram positif (*S. iniae*). Setiap bakteri memiliki sensitivitas yang berbeda terhadap senyawa antibakteri. Menurut Bibiana dan Nithyanand (2014), bakteriosin bakteri *Bacillus sp.* lebih aktif pada bakteri Gram negatif daripada bakteri Gram positif. Selain itu, Khoiriyah *et al.* (2014) menyatakan bahwa *Pseudomonas sp* lebih sensitif terhadap bakteriosin dari *Lactobacillus sp* dari pada mikrob uji yang lain dengan ditunjukkan dengan zona bening yang lebih besar.

### SIMPULAN

Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa *B. subtilis* mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. iniae* dan *P. fluorescens*. Bakteri *B. subtilis* memiliki aktivitas antagonis terhadap *S. iniae* dan *P. fluorescens*. Aktivitas antibakteri dimulai pada inkubasi enam jam, dan mencapai nilai maksimum pada awal fase stasioner.

### SARAN

Pada penelitian ini masih diperlukan penelitian mengenai pengaruh senyawa antibakteri dari *B. subtilis* terhadap infeksi *S. iniae* dan *P. fluorescens* pada ikan air tawar secara *in vivo*.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan melalui Bantuan Operasional Perguruan Tinggi Negeri (BOPTN)

Universitas Brawijaya TA 2015, Nomor DIPA: SP DIPA-042.04.2.400072/2015, Tanggal 5 April 2015. Untuk itu melalui kesempatan ini, peneliti menyampaikan terima kasih kepada Fakultas Perikanan dan Ilmu kelautan, Unibraw, Malang.

### DAFTAR PUSTAKA

- Agnew W, Barnes AC. 2007. *Streptococcus iniae*: An Aquatic Pathogen of Global Veterinary Significance and a Challenging Candidate for Reliable Vaccination. *Vet Microbiol* 122: 1-15.
- Ahern M, Verschueren S, Sinderen DV. 2003. Isolation and Characterisation of a novel Bacteriocin Produced by *Bacillus thuringiensis* Strain B439. *Microbiol* 220: 127-131.
- Ansari A, Aman A, Siddiqui NN, Iqbal S, Qader, SAU. 2012. Bacteriocin (BAC IB17): Screening, isolation and production from *Bacillus subtilis* KIBGE IB 17. *Pak J Pharm Sci* 25(1): 195-201.
- Austin B, Austin DA. 2007. *Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish*, 4<sup>th</sup> Ed. Chichester, England. Springer, Praxis Publishing Ltd.
- Bibiana S, Nithyanand P. 2014. Screening and Evaluation of Marine Bacteriocins against Aquaculture pathogens. *Int J Pharm Tech Res* 6(5): 1482-1489.
- Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA. 2007. *Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology*. 24<sup>th</sup> Ed. New York. The McGraw-Hill Companies.
- Chavan MA, Riley MA. 2007. Molecular Evolution of Bacteriocins in Gram-Negative Bacteria, In Riley MA, Chavan MA (Ed) *Bacteriocins: Ecology and Evolution*. 5-18, ISBN 3-540-36603-2, Heidelberg, Germany.
- Das BK, Nidhi RGN, Roy P, Muduli AK, Swain P, Mishra SS, Jayasankar P. 2014. Antagonistic activity of cellular components of *Bacillus subtilis* AN11 against bacterial pathogens. *Int J Curr Microbiol App Sci* 3(5): 795-809.
- Fardiaz S. 1992. *Analisis Mikrobiologi Pangan*. Jakarta. Raja Grafindo Persada.

- Gillor O, Etzion A, Riley MA. 2008. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl Microbiol Biotechnol* 81(4): 591-606.
- Green DH, Wakeley PR, Page A, Barnes A, Baccigalupi L, Ricca E, Cutting SM. 1999. Characterization of Two *Bacillus* Probiotics. *Appl Environ Microbiol* 65(9): 4288-4291.
- Hageman AH, Shankweiler GW, Wall PR, Franich K, Mc Cowan GW, Cauble SM, Grajeda J, Quinones C. 1984. Single, Chemically Defined Sporulation Medium for *Bacillus subtilis*: Growth, Sporulation, and Extracellular Protease Production. *J Bacteriol* 160(1): 438-441.
- Khoiriyah H, Ardiningsih P, Jayuska A. 2014. Penentuan Waktu Inkubasi Optimum terhadap Aktivitas Bakteriosin *Lactobacillus sp.* Red. *Jurnal Kimia Khatulistiwa* 3(1): 7-12.
- Mazza P. 1994. The use of *Bacillus subtilis* as an antidiarrhoeal microorganism. *Boll Chim Farm* 133: 3-18.
- Nagarajan S, Kulandaivel S, Balaji R, Santhanakaruppu R, Nandhini GG. 2014. Antagonistic Compounds Produced by Consortium of Probiotic Bacteria against Fish Pathogens. *IJSR* 3(12): 28-32.
- Ogunbanwo ST, Sanni AI, Onilude AA. 2003. Influence of cultural conditions on the production of bacteriocins by *Lactobacillus brevis* OG1. *Afric J Biotechnol* 2(7): 179-184.
- Oscariz JC, Lasa I, Pisabarro AG. 1999. Detection and Characterization of Cerein 7 a New Bacteriocin Produced by *Bacillus cereus* with a Broad Spectrum of Activity. *Fems Microbiol Lett* 178: 337-341.
- Pelczar MJ, Chan ECS, Krieg NR. 1986. *Microbiology*. 5<sup>th</sup> Ed. New York. McGraw-Hill Education,
- Post G. 1987. *Textbook of Fish Health*, 2<sup>nd</sup> Ed. New York. TFH Publication Inc.
- Prihatiningsih N, Arwiyanto T, Hadisutrisno B, Widodo J. 2014. Seleksi Mutan Antibiosis *Bacillus subtilis* B315 untuk Pengendalian *Ralstonia solanacearum* PR7. *Agrin* 18(1): 67-79.
- Riley MA, Wertz JE. 2002. Bacteriocins: Evolution, Ecology and Application. *Annu Rev Microbiol* 56: 117-137.
- Sansawat A, Thirabunyanon M. 2009. Anti-*Aeromonas hydrophila* activity and characterisation of novel probiotic strains of *Bacillus subtilis* isolated from the gastrointestinal tract of giant freshwater prawns. *Maejo Int J Sci Technol* 3(01): 77-87.
- Sarter S, Nguyen HNK, Hung LT, Lazard J, Montet D. 2007. Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria isolated from farmed catfish. *Food Control* 18: 1391-1396.
- Shoemaker CA, Xu D, Evans JJ, Klesius PH. 2006. Parasites and Diseases. Dalam Lim C, Webster CD. (Ed), *Tilapia Biology, Culture and Nutrition*. New York. Haworth Press Inc. Hlm. 561-582.
- Sugita H, Okano R, Suzuki Y, Iwai D, Mýzukami M, Akiyama N, Matsuura S. 2002. Antibacterial abilities of intestinal bacteria from larval and juvenile Japanese flounder against fish pathogens. *Fish Sci* 68: 1004-1011.
- Vine NG, Leukes WD, Kaiser H. 2004. In vitro growth characteristics of five candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus. *FEMS Microbiol Lett* 231: 145-152.
- Willey JM, Sherwood LM, Woolverton CJ. 2011. Prescott's Microbiology, 8<sup>th</sup> Ed. New York. McGraw-Hill Education.
- Xie J, Zhang R, Shang C, Guo Y. 2009. Isolation and characterization of a bacteriocin produced by an isolated *Bacillus subtilis* LFB112 that exhibits antimicrobial activity against domestic animal pathogens. *Afr J Biotechnol* 8(20): 5611-5619.