

**POTENSI BEBERAPA ISOLAT BAKTERI DARI SISTEM PENCERNAAN SIDAT (*Anguilla* sp.)
UNTUK FERMENTASI PAKAN SPESIFIK**

Miratul Maghfiroh, Nina Hermayani Sadi, Fauzan Ali, Triyanto
Pusat Penelitian Limnologi LIPI, Kompleks Cibinong Science Center
Jalan Raya Bogor Jakarta km. 46, Cibinong, Jawa Barat 16911
miratul@limnologi.lipi.go.id

ABSTRAK

Pemerintah Indonesia terus menggalakkan peningkatan produksi akuakultur dari tahun ke tahun. Namun demikian, kendala dan tantangan dalam mencapai target produksi yang berkesinambungan perlu mendapat solusi yang efektif. Pakan ikan masih menjadi proporsi paling besar dalam total biaya produksi akuakultur. Oleh karena itu, studi mengenai pakan alternatif masih menjadi topik penelitian yang penting. Salah satu alternatif solusi yakni pakan fermentasi dari bahan inferior menggunakan bantuan mikroba lokal. Akuakultur sidat (*Anguilla* sp.) di Indonesia memiliki prospek yang baik dan menjanjikan namun pakan spesifik saat ini masih belum tersedia. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari potensi isolat bakteri dari sistem pencernaan sidat sebagai starter fermentasi bahan baku pakan ikan sidat. Kegiatan isolasi dan analisis dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Pusat Penelitian Limnologi LIPI. Diseksi bagian ventral limaikan sidat dilakukan secara aseptis. Bagian pencernaan ditimbang dan disimpan di dalam larutan 0.9% NaCl. Pengenceran berseri disiapkan dan plating pada media Nutrient Agar (NA) yang dimodifikasi. Seleksi koloni didasarkan pada ciri morfologi. Analisis terhadap isolat terpilih meliputi uji biokimiawi, uji kualitatif dan uji kuantitatif. Dari total dua belas isolat, isolat BIOF2 potensial untuk fermentasi protein, isolat SUE2 untuk degradasi amilosa dan SUE6 untuk degradasi lipida. Penelitian selanjutnya difokuskan pada identifikasi isolat potensial secara molekuler, aplikasi enzim bakteri terhadap bahan baku, dan uji preferensi pakan pada sidat.

Kata kunci: *Anguilla* sp., isolat bakteri, sistem pencernaan, sidat, pakan ikan

PENDAHULUAN

Pakan buatan masih menjadi persoalan utama dalam budidaya ikan karena mencapai hingga 70% dari total biaya operasional yang dibutuhkan (Mansyur & Tangko, 2008). Salah satu kendala yang dihadapi yaitu adanya ketergantungan terhadap bahan/pakan impor dengan harga yang masih mahal. Berbagai alternatif pakan ikan telah dikembangkan baik melalui substitusi dengan bahan baku lokal (Abidin, Junaidi, Cokrowati, & Yuniarti, 2015) atau dengan bantuan mikroorganisme yang bertujuan untuk menambah nilai manfaat pakan (Mulia, Yuliningsih, Maryanto, & Purbomartono, 2016).

Mikroorganisme telah lama digunakan untuk membantu manusia dalam proses pengolahan makanan (atau pakan) yang lebih dikenal dengan fermentasi. Di dalam teknologi fermentasi, penambahan mikroorganisme tertentu ke dalam substrat dapat bermanfaat (1) meningkatkan nilai gizi (Muhiddin, Juli, & Aryantha, 2009; Setiyawan, 2007) yaitu dengan adanya peningkatan senyawa bioaktif seperti peptide atau isoflavon pada tepung kedelai (Sanjukta & Rai, 2016) (2) memperbaiki organoleptik bahan baku (Hasbullah, Silia, & Sugihono, 2014) (3) sebagai agensi probiotik (Mansyur & Tangko, 2008) yang dapat membantu memperbaiki imunitas terhadap mikroorganisme patogen (Farias *et al.*, 2016). Selain itu fermentasi dapat mereduksi komponen antinutrisi seperti inhibitor, asam fitat dan tanin (Egounlety & Aworh, 2003).

Mikroorganisme yang sering digunakan sebagai pelaku utama proses fermentasi dapat berasal dari golongan bakteri, kapang, dan khamir. Golongan bakteri fermentasi bahan pangan antara lain *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. plantarum*, *Lb. delbrueckii*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium infantis*, *B. longum*, *B. breve*. Untuk golongan kapang, *Aspergillus*, *Cyberlindnera*, *Cystofilobasidium*, *Dekkera*, *Guehomyces*, *Hanseniaspora*, *Kazachstania*, *Lachancea*, *Lecanicillium*, *Mucor*, *Neurospora* dan *Rhizopus* adalah genera yang umum dipakai untuk inokulum fermentasi. Sedangkan dari golongan khamir adalah dari genus *Candida* (Bourdichon *et al.*, 2012).

Isolasi mikroba dari sistem pencernaan ikan telah umum dilakukan antara lain untuk digunakan sebagai probiotik atau inokulum fermentasi untuk bahan pakan (Watson, Preedy, & Gatesoupe, 2016).

Isolat yang didapatkan dari lingkungan spesifik ikan tertentu diharapkan lebih sesuai ditinjau dari aplikasinya. Misalnya, fermentasi pakan dengan menggunakan isolat mikroba dari sistem pencernaan spesifik

ikan diharapkan dapat meminimalisir resistensi ikan terhadap pakan yang diujicobakan; dibandingkan dengan fermentasi pakan dengan isolat mikroba dari lingkungan luar yang tidak spesifik terhadap ikan target. Meskipun penelitian mengenai isolasi bakteri telah banyak dilakukan, namun demikian informasi mengenai isolasi bakteri dari sistem pencernaan ikan sidat untuk agensia fermentasi pakan spesifik belum teridentifikasi. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan identifikasi morfologi, biokimiawi dan aktivitas enzimatis isolat bakteri potensial untuk fermentasi bahan pakan ikan sidat. Isolat bakteri didapatkan dari sistem pencernaan ikan sidat (*Anguilla* sp.).

METODE PENELITIAN

Isolasi Bakteri dari Pencernaan Ikan sidat

Sebanyak tiga ikan sidat (*Anguilla* sp.) diambil dari kolam pemeliharaan laboratorium basah Pusat Penelitian Limnologi LIPI. Tiga sidat terpilih ini berada dalam fase yang seragam yang diamati dari panjang, dan berat badan (Tabel 1). Selain itu, dua ikan sidat berbeda yang didapatkan dari budidaya lokal di daerah Cileutu, Jawa Barat juga dilakukan diseksi. Rerata panjang badan ~35.5 cm dengan berat ~130 g.

Tabel 1. Morfologi sidat untuk mendapatkan isolat bakteri

Spesimen	Panjang badan (cm)	Berat (g)	Panjang sistem pencernaan (cm) (Lambung dan usus)	Berat sistem pencernaan (g) (Lambung dan usus)
1	42	128	7.5	1.78
2	36	83	9.4	2.18
3	37	106	13	1.32

Sidat dianestesi dengan menggunakan kloroform lalu dibersihkan badan dari kotoran dengan akuades steril sebanyak tiga kali. Diseksi dilakukan dengan membedah bagian ventral abdomen dan mengeluarkan/memotong bagian pencernaannya (lambung dan usus). Bagian ini kemudian diukur berat dan panjang.

Bagian pencernaan ini dibasuh dengan akuades steril sebanyak tiga kali kemudian digerus dan dicampur dalam larutan fisiologis steril NaCl 0.9%. Campuran dikocok agar homogen selama satu jam. Pengenceran berseri dilakukan hingga 10E-6 dan *plating* ke media NA (*Nutrient Agar*) yang dimodifikasi. Komposisi NA (dalam 1L) yaitu: *Beef extract*, *peptone*, agar (20 gr), albumin, *soluble starch*. Untuk enumerasi total bakteri, dilakukan *plating* ke dalam media NA tanpa modifikasi dengan serial pengenceran hingga 10E-7. Inkubasi dilakukan selama 24 jam pada suhu 34°C. Koloni yang tumbuh pada media NA modifikasi diseleksi menurut morfologi koloni yang tampak. Koloni yang berbeda diisolasi hingga didapatkan kultur murninya menggunakan metode isolasi koloni tunggal. Isolat yang didapatkan dari ikan sidat Puslit Limnologi teridentifikasi sebagai isolat SUE sedangkan isolat lain sebagai BIOF.

Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram dilakukan untuk identifikasi awal bakteri untuk mengetahui morfologi sel. Prosedur pewarnaan Gram sebagai berikut. Sel bakteri yang digunakan untuk pengujian berumur tidak lebih dari 24 jam. Sebanyak satu *loop* sel bakteri diambil dan dipindahkan ke atas kaca preparat. Fiksasi preparat dilakukan dengan cara melewatkannya di atas api bunsen.

Kristal violet diteteskan ke atas preparat sebanyak 1-2 tetes dan dibiarkan selama 20 detik kemudian dibilas dengan aquadest. Gram's iodin kemudian ditambahkan pada preparat. Setelah satu menit, preparat dibilas dengan aquadest. Untuk tahap dekolorisasi, preparat dibilas dengan alkohol 95% hingga terlihat solven bersih dari pewarnaan sebelumnya. Dekolorisasi dihentikan dengan cara membilas preparat menggunakan aquadest. Pewarna Safranin diaplikasikan pada preparat selama 1 menit setelah itu dibersihkan dengan bilasan aquadest dan dikering-anginkan. Preparat yang telah dilakukan pewarnaan Gram, diamati di bawah mikroskop (Olympus, USA) dengan pembesaran sebesar 1.000X (Scherrer, 1984).

Uji Biokimiawi Isolat Terpilih

Identifikasi karakteristik biokimiawi dilakukan dengan bantuan kit komersial (KB001 HimVic, Himedia). Kit ini menggunakan sistem identifikasi kolorimetri yang terstandarisasi. Pengujian didasarkan pada prinsip perubahan pH dan penggunaan substrat oleh sel mikroorganisme yang digunakan dalam pengujian. Satu koloni isolat terpisah yang tumbuh pada media padat NA, diambil dan ditumbuhkan pada media cair NB

volume 5 ml. Inkubasi pada suhu 34^0 - 35^0 C hingga didapatkan OD $>0,1$ pada $\lambda = 620$ nm. Setelah turbiditas yang diinginkan dicapai, sebanyak 50 μ l suspensi bakteri diinokulasikan ke atas sumur pada kit. Pembacaan berdasarkan perubahan warna dilakukan setelah inkubasi selama 24 jam pada suhu 34^0 - 35^0 C.

Uji Kualitatif

Penapisan isolat terpilih terhadap kemampuan hidrolisis makromolekul terpilih (pati, susu skim, lipid) didasarkan pada perubahan visual dari media padat yang dimodifikasi. Pada media NA, ditambahkan masing-masing 1% pati, susu skim, atau minyak zaitun + rhodamine B. Sedangkan kadar *beef extract* dan *peptone* dikurangi hingga 30% dari penggunaan normal. Koloni bakteri ditotolkan ke atas media modifikasi secara aseptis kemudian diinkubasi selama 7 hari pada suhu 34^0 C. Identifikasi adanya hidrolisis substrat diobservasi dari zona bening pada media penambahan pati 1% setelah diteteskan iodine 1%. sedangkan hidrolisis protein dicirikan dengan adanya zona bening yang mengelilingi koloni bakteri. Untuk hidrolisis lipid diperlihatkan dengan adanya pendaran warna pink di bawah paparan sinar UV (Ari & Subagyo, 2012; Dahliaty, Susanti, & Haryani, 2012; Paramita DAS, Sudipta Mandal, Argha Khan, Sanjib Manna, 2014).

Uji Kuantitatif Ekstrak Kasar Proteolitik

Satu *loop* diambil dari koloni bakteri terpisah yang ditumbuhkan pada NA plate selama 24 jam suhu 34 - 35^0 C dan ditransfer ke dalam media NB sebanyak 1 ml. Inkubasi dilakukan pada kondisi yang sama. Setelah 24 jam, bakteri yang tumbuh diinokulasikan pada Erlenmeyer berisi media NB steril sebanyak 100 ml dan diinkubasi dengan kondisi yang sama.

Ekstraksi enzim proteolitik secara kasar didapatkan dengan cara sentrifugasi (Baehaki *et al.*, 2011). Sebanyak 100 ml suspensi bakteri dalam media NB dipisahkan dengan menggunakan sentrifus pada kecepatan 5.000 rpm selama 15 menit. Supernatan diambil untuk dikuantifikasi aktivitas enzim proteolitik.

Aktivitas proteolitik dianalisis dengan mengacu pada prosedur Cupp-Enyard (2008) dengan beberapa penyesuaian dan modifikasi terhadap konsentrasi reagen kimia yang digunakan. Sebanyak 200 μ l kasein (0.5%) dan 100 μ l sampel proteolitik dicampur ke dalam tabung reaksi dan diinkubasi selama 20 menit pada *shaker incubator* suhu ruang dan suhu 34^0 C kemudian ditambahkan 250 μ l TCA 0,4 M dan dilanjutkan dengan inkubasi pada kondisi sama. Sampel kemudian disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 10.000 rpm. Supernatan sebanyak 100 μ l dipisahkan dan dicampur dengan 500 μ l Na_2CO_3 0,4 M dan fenol folin sebanyak 100 μ l. Inkubasi larutan ini selanjutnya dilakukan dalam *shaker incubator* selama 20 menit suhu 34^0 C. Pengukuran absorbansi aktivitas enzim menggunakan metode spektrofotometri dengan panjang gelombang 660 nm. Kurva standar BSA (*Bovine Serum Albumin*) diplot untuk menentukan nilai konsentrasi enzim.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pewarnaan Gram

Identifikasi morfologi bakteri melalui pewarnaan Gram telah umum dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan informasi mengenai kekhasan dinding sel bakteri yang diteliti. Pewarnaan Gram tidak diperuntukkan untuk identifikasi bakteri pada level spesies namun demikian, pewarnaan Gram berguna dalam pengelompokan bakteri menurut sifat kimiawi dinding sel antara kelompok Gram positif dan negatif. Kelompok Gram positif memiliki lapisan peptidoglikan yang lebih tebal (~90%) daripada kelompok Gram negatif (~10%). Implikasinya, sel golongan Gram positif mengikat kuat pewarna kristal violet sedangkan golongan Gram negatif tidak dapat mempertahankan pewarna violet setelah perlakuan dekolorisasi dengan alkohol. Dari keduabelas isolat, hanya satu isolat menunjukkan hasil positif pewarnaan Gram (isolat SUE2). Hasil identifikasi Gram tertera pada Tabel 2 berikut ini. Seluruh isolat menunjukkan bentuk sel batang.

Uji Biokimiawi

Melalui uji biokimiawi, preferensi metabolisme isolat terpilih terhadap substrat tertentu dapat diketahui dan dapat dijadikan informasi dasar untuk pemanfaatannya dalam pengolahan pakan/pangan. Meskipun demikian, hasil identifikasi karakter biokimiawi tidak dapat digunakan dalam identifikasi tingkat spesies karena beberapa bakteri dalam spesies yang sama dapat saja memiliki respon yang berbeda terhadap metabolisme substrat yang sama. Semua isolat memperlihatkan hasil negatif untuk uji indol (Tabel 3). Hal ini berarti tidak terdeteksi adanya indol sebagai hasil pemecahan atau metabolisme tryptophan. Demikian juga untuk uji metil merah, semua isolat menunjukkan hasil negatif. pH akhir inkubasi untuk fermentasi substrat lebih cenderung basa daripada asam. Uji Voges Proskauer berguna dalam deteksi acetoin dalam media. Hanya isolat SUE3 dan BIOF2 yang memperlihatkan hasil positif dimana pemecahan glukosa akan berasksi dengan alpha naphtol dan potassium hidroksida sehingga membentuk senyawaan berwarna merah. Dari dua belas isolat, sembilan diantaranya (SUE1,3,4,5,7,8,9, BIOF2 dan 5) dapat memetabolisme sitrat sebagai sumber

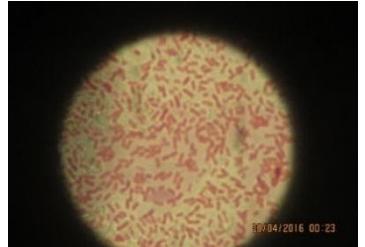
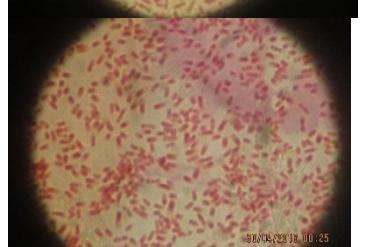
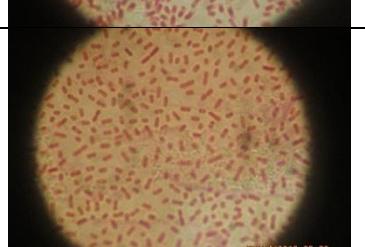
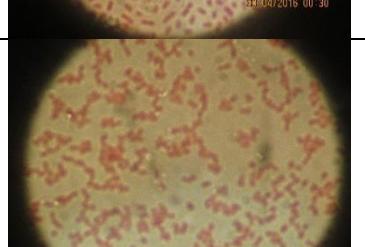
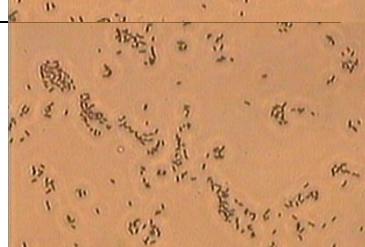
energi dan karbon. Pada media sitrat, reaksi positif diindikasikan dengan adanya perubahan warna dari hijau ke biru.

Uji lainnya yang juga termasuk ke dalam biokimiawi yaitu penggunaan golongan gula seperti glukosa, adonitol, arabinose, laktosa, sorbitol, mannitol, rhamnosa, dan sukrosa. Isolat yang dapat memetabolisme seluruh golongan gula yang diujikan yaitu SUE2,3,5,6,7,8,9 dan BIOF5. Isolat SUE1, SUE4, BIOF2 dan BIOF3 menggunakan sebagian gula yang diujikan.

Tabel 2. Hasil pewarnaan Gram isolat bakteri

No	Isolat	Bentuk sel	Jenis Gram	Gambar
1	SUE1	Batang	(-)	
2	SUE2	Batang	(+)	
3	SUE3	Batang	(-)	
4	SUE4	Batang	(-)	
5	SUE5	Batang	(-)	

Lanjutan Tabel 2.

No	Isolat	Bentuk sel	Jenis Gram	Gambar
6	SUE6	Batang	(-)	
7	SUE7	Batang	(-)	
8	SUE8	Batang	(-)	
9	SUE9	Batang pendek	(-)	
10	BIOF2	Batang	(-)	
11	BIOF3	Batang	(-)	
12	BIOF5	Batang	(-)	

Bakteri seperti *E. coli* memiliki karakteristik biokimiawi tertentu dalam menggunakan golongan gula. *E. coli* dapat memetabolisme tujuh golongan gula seperti glukosa, arabinose, laktosa, sorbitol, mannos, rhamnosa, dan sukrosa namun tidak dapat memfermentasi adonitol (Silva *et al.*, 1980). Berbeda dengan golongan *Salmonella*, bakteri ini secara umum tidak memfermentasi adonitol dan sukrosa. Sedangkan hasil reaksi dapat berbeda pada setiap spesies *Salmonella* dalam memetabolisme laktosa (Cox & Williams, 1976).

Tabel 3. Hasil uji biokimiawi isolat terpilih

Isolat	Jenis Uji											
	Indol	Metil Merah	Voges Proskauer's	Sitrat	Glukosa	Adonitol	Arabinosa	Laktosa	Sorbitol	Manitol	Rhamnosa	Sukrosa
SUE1	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
SUE2	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
SUE3	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SUE4	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+
SUE5	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SUE6	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
SUE7	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SUE8	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SUE9	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BIOF2	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
BIOF3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
BIOF5	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Uji Kualitatif Enzimatis

Uji kualitatif enzimatis dapat membantu dalam penapisan awal untuk isolat bakteri yang potensial dalam melakukan fermentasi melalui observasi kemampuan dalam mendegradasi makromolekul terpilih. Uji kualitatif yang dilakukan meliputi uji kemampuan amilolitik, lipolitik dan proteolitik.

Dari ketiga macam pengujian, didapatkan informasi bahwa tiga isolat menunjukkan kemampuan dalam menghasilkan enzim amilolitik (SUE3) dan lipolitik (SUE6). Sedangkan, isolat BIOF2 memperlihatkan kemampuan mendegradasi ketiga macam makromolekul (Tabel 4).

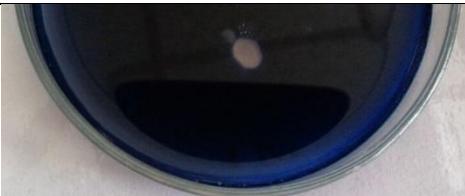
Studi mengenai isolasi bakteri dari sistem pencernaan ikan telah banyak dilakukan (Abhinanda Bairagi, Ghosh, Sen, & Ray, 2002b; Dan & Ray, 2014; Ghosh, Sen, & Ray, 2002). Tujuan yang umum dicapai adalah untuk mendapat manfaat dari karakteristik bakteri terisolasi misalnya kemampuan dalam menjadi agensia probiotik (Askarian, Kousha, Salma, & Ringø, 2011), atau digunakan sebagai penghasil enzim ekstraselular (Bairagi, Ghosh, Sen, & Ray, 2002a). Studi isolasi bakteri dari sistem pencernaan ikan sidat merupakan studi awal dalam usaha untuk mendapatkan bakteri potensial yang akan digunakan untuk fermentasi bahan pakan spesifik untuk sidat.

Uji Kuantitatif Enzimatis dari Isolat Terpilih

Berdasarkan skrining uji kualitatif enzimatis, isolat BIOF2 sebagai produsen multi-enzim, dipilih untuk diteliti lebih lanjut pada uji kuantitatif enzimatis. Pada tahap ini, hanya aktivitas proteolitik yang dipilih untuk diujikan karena pada penelitian mendatang, enzim kasar hasil sekresi isolat BIOF2 akan diujicobakan untuk fermentasi beberapa bahan pakan ikan sidat. Hasil uji kuantitatif proteolitik tertera pada Tabel 5.

Konsentrasi enzimatis proteolitik dari isolat BIOF2 ini relatif lebih rendah dibandingkan dengan beberapa penelitian sejenis (tanpa perlakuan optimasi) yang mengisolasi bakteri dari pencernaan ikan (Bairagi, Ghosh, Sen, & Ray, 2002b) maupun dari lingkungan (Rusdwitasari & Wikandari, 2014). Hal ini dapat terjadi antara lain karena (1) faktor optimasi lingkungan; ataupun (2) faktor lain misalnya dalam sistem pencernaan ikan sidat sendiri diduga memiliki aktivitas proteolitik yang lebih beragam dan efektif dibandingkan dengan isolat BIOF2 sehingga bakteri pencernaan seperti isolat BIOF2 tidak menghasilkan enzim proteolitik dengan aktivitas yang relatif tinggi. Degradasi protein diduga lebih mengandalkan sistem enzimatis pencernaan dibandingkan dari sumber mikroflora.

Tabel. 4 Hasil uji kualitatif isolat terpilih

No	Isolat	Gambar	Keterangan
1	SUE3		Diameter zona bening terukur 0,7 cm
2	SUE6		SUE6 memperlihatkan akumulasi warna merah muda di sekitar koloni sel
3	BIOF2		Isolat BIOF2 memiliki potensi sebagai penghasil enzim amilolitik (zona bening pada media yang telah diberi Iod (ungu), lipolitik (akumulasi warna merah muda), dan proteolitik (zona bening pada media))

Tabel 5. Hasil uji kuantitatif proteolitik

Kondisi	Aktivitas Enzim (U/ml)
Inkubasi pada suhu ruang, pH netral	0,082
Inkubasi pada suhu 34 ⁰ C pH netral	0,088

KESIMPULAN

Eksperimen dengan tujuan melakukan identifikasi awal isolat potensial untuk fermentasi bahan pakan spesifik telah dilakukan antara lain melalui pewarnaan Gram, uji biokimiawi, uji kualitatif dan uji kuantitatif enzimatis. Hasil pewarnaan Gram menunjukkan bahwa hanya ada satu isolat (SUE2) yang termasuk golongan Gram positif. Hasil uji biokimiawi menginformasikan bahwa SUE2,3,5,6,7,8,9 dan BIOF5 dapat menggunakan seluruh golongan gula yang diujikan dengan memberikan hasil positif pada akhir inkubasi. Pada uji kualitatif enzimatis, didapatkan informasi bahwa isolat SUE3, 6 dan BIOF2 dapat menjadi isolat potensial untuk fermentasi makromolekul seperti amilosa, lipid, dan protein. Sedangkan aktivitas enzimatis proteolitik isolat BIOF2 terukur sebesar ~0,08 U/ml.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis berterima kasih pada kegiatan Ristek Unggulan Tahun 2016 Puslit Bioteknologi LIPI untuk dukungan dana penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Abidin, Z., Junaidi, M., Cokrowati, N., & Yuniarti, S. (2015). Pertumbuhan dan konsumsi pakan ikan lele (*Clarias sp.*) yang diberi pakan berbahan baku lokal. *Depik*, 4(1), 33–39.
- Ari, W., & Subagyo. (2012). Isolasi dan Seleksi Bakteri Penghasil Enzim Ekstraseluler (proteolitik , amilolitik , lipolitik dan selulolitik) yang Berasal dari Sedimen Kawasan Mangrove. *Jurnal Ilmu Kelautan*, 17(3), 164–168.
- Askarian, F., Kousha, A., Salma, W., & RingØ, E. (2011). The effect of lactic acid bacteria administration on growth, digestive enzyme activity and gut microbiota in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) and beluga (*Huso huso*) fry. *Aquaculture Nutrition*, 17(5), 488–497. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2010.00826.x>
- Baehaki, A., Rinto, E. Relis (2011). Isolasi bakteri dan karakterisasi proteolitik dari saluran pencernaan ikan Rawa Indralaya, Sumatera Selatan. Prosiding Seminar Nasional Inovasi Teknologi Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan III.
- Bairagi, A., Ghosh, K. S., Sen, S. K., & Ray, A. K. (2002a). Duckweed (*Lemna polyrhiza*) leaf meal as a source of feedstuff in formulated diets for rohu (*Labeo rohita Ham.*) fingerlings after fermentation with a fish intestinal bacterium, *Bioresour. Technol.* 85, 17–24.
- Bairagi, A., Ghosh, K. S., Sen, S. K., & Ray, A. K. (2002b). Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. *Aquaculture International*, 10(2), 109–121. <http://doi.org/10.1023/A:1021355406412>
- Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J. C., Gerds, M. L., Hammes, W. P., ... Hansen, E. B. (2012). Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. *International Journal of Food Microbiology*, 154(3), 87–97. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.030>
- Cox, N.A & J.E. Williams. 1976. A simplified biochemical system to screen *Salmonella* isolates from poultry for serotyping. *Poultry Science*. 55(5):1968-1971.
- Dahliaty, A., Susanti, R., & Haryani, Y. (2012). Skrining Bakteri Lipolitik dari Sungai Siak di Daerah Pelita Pantai Kota Pekanbaru. *J. Ind. Che. Acta*, 3(1), 1–4.
- Dan, S. K., & Ray, A. K. (2014). Characterization and identification of phytase-producing bacteria isolated from the gastrointestinal tract of four freshwater teleosts. *Annals of Microbiology*, 64(1), 297–306. <http://doi.org/10.1007/s13213-013-0664-3>
- Egounlety, M., & Aworh, O. C. (2003). Effect of soaking, dehulling, cooking and fermentation with *Rhizopus oligosporus* on the oligosaccharides, trypsin inhibitor, phytic acid and tannins of soybean (*Glycine max* Merr.), cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and groundbean (*Macrotyloma geocarpa* Ha. *Journal of Food Engineering*, 56(2–3), 249–254. [http://doi.org/10.1016/S0260-8774\(02\)00262-5](http://doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00262-5)
- Farias, T. H. V., Levy-Pereira, N., Alves, L. de O., Dias, D. de C., Tachibana, L., Pilarski, F., ... Ranzani-Paiva, M. J.

- T. (2016). Probiotic feeding improves the immunity of pacus, *Piaractus mesopotamicus*, during *Aeromonas hydrophila* infection. *Animal Feed Science and Technology*, 211, 137–144. <http://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.11.004>
- Ghosh, K., Sen, S. K., & Ray, A. K. (2002). Characterization of Bacilli Isolated from the Gut of Rohu, *Labeo rohita*, Fingerlings and Its Significance in Digestion. *Journal of Applied Aquaculture*, 12(3), 33–42. http://doi.org/10.1300/J028v12n03_04
- Hasbullah, Silia, N., & Sugihono, C. (2014). Pengaruh Jenis Bahan Fermentasi dan Perendaman Terhadap Sifat Kimia dan Organoleptik Mocaf (Modified Cassava Flour). *Agrifood*, 1(1), 14–19.
- Mansyur, A., & Tangko, M. (2008). Probiotik : Pemanfaatannya Untuk Pakan Ikan Berkualitas Rendah. *Media Akuakultur*, 3(2), 145–149.
- Muhiddin, N. H., Juli, N., & Aryantha, I. N. P. (2009). Peningkatan Kandungan Protein Kulit Ubi Kayu Melalui Proses Fermentasi. *Jurnal Matematika & Sains*, 6(1), 1–12.
- Mulia, D. S., Yuliningsih, R. T., Maryanto, H., & Purbomartono, C. (2016). Pemanfaatan Limbah Bulu Ayam menjadi bahan Pakan Ikan dengan fermentasi *Bacillus subtilis*. *Manusia Dan Lingkungan*, 23(1), 49–57.
- Paramita DAS, Sudipta Mandal, Argha Khan, Sanjib Manna, K. G. (2014). Distribution of extracellular enzyme-producing bacteria in the digestive tracts of 4 brackish water fish species. *Turkish Journal of Zoology*, 38, 79–88. <http://doi.org/10.3906/zoo-1205-3>.
- Rusdwitasari, Y.N & P.R. Wikandari. (2014). Aktivitas bakteri proteolitik yang diisolasi dari sumber air panas Singgahan, Tuban. *UNESA Journal of Chem*. 3(3).
- Sanjukta, S., & Rai, A. K. (2016). Production of bioactive peptides during soybean fermentation and their potential health benefits. *Trends in Food Science and Technology*, 50, 1–10. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.01.010>
- Scherrer, R. (1984). Gram's staining reaction, Gram types and cell walls of bacteria. *Trends in Biochemical Sciences*. Elsevier Current Trends. [http://doi.org/10.1016/0968-0004\(84\)90077-X](http://doi.org/10.1016/0968-0004(84)90077-X)
- Setiyatwan, H. (2007). Peningkatan Kualitas Nutrisi Duckweed Melalui Fermentasi Menggunakan *Trichoderma harzianum*. *Jurnal Ilmu Ternak*, 7(2).
- Silva R.M., Toledo M.R., Trabulsi L.R. (1980). Biochemical and cultural characteristics of invasive *E. coli*. *Journal of Clinical Microbiology*. 11(5):441-444.
- Watson, R. R., Preedy, V. R., & Gatesoupe, F. J. (2016). Chapter 21 – Probiotics and Other Microbial Manipulations in Fish Feeds: Prospective Update of Health Benefits. In *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics* (pp. 319–328). <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-802189-7.00021-6>