

Karakterisasi Molekuler Bakteri Probiotik Ikan Kerapu Bebek Berbasis Teknik 16S Ribosomal DNA

Feliatra, Nursyirwani, & Wahyudi Andrito

Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Riau, Pekanbaru 28293
Email: feliatra@yahoo.com

Diterima 13-05-2007

Disetujui 02-09-2007

ABSTRACT

The aim of research was to find the molecular characteristics of probiotic bacteria in the digestive tract of grouper fish (*Chromileptes altivelis*) based on 16S ribosomal DNA technique. The bacteria were isolated from stomach and intestine of the fish and were analyzed in the Marine Microbiology Laboratory of fishery and marine Science Faculty of Riau University. The bacterial DNA were isolated by using a PCR (polymerase Chain Reaction) and was conducted in the biotechnology laboratory of Diponegoro University, Semarang. The purified DNA was sequenced in the BPPT Tangerang. Result shown that 6 bacterial species may be potential as probiotic. There were *Bacillus velesensis* strain CR-11, *Vibrio alginolyticus* A3G-2, *Bacillus cereus* site2S, uncultured bacterium clone BB3S16S-17, *Bacillus subtilis* strain CICC10066, and *Bacillus flexus* strain LF-3. these bacteria grow well at pH 2 and this indicated one of probiotic bacteria characteristics.

Keywords: bacteria, DNA, fish, probiotic

PENDAHULUAN

Pesatnya perkembangan usaha pembesaran ikan kerapu bebek tidak didukung oleh ketersediaan pakan, sehingga di beberapa daerah yang potensial untuk pengembangan usaha pembesaran sering terjadi kendala kekurangan pakan. Dalam usaha pembesaran ikan, pakan merupakan faktor utama yang harus terus tersedia dan menjadi salah satu faktor keberhasilan dalam budidaya ikan. Ketersediaan pakan yang berkualitas dengan memperhatikan keseimbangan gizi dan jumlah yang sesuai dengan kebutuhan, tepat waktu dan berkelanjutan membutuhkan biaya produksi yang cukup besar (Akbar 2005).

Sebagai pengganti antibiotik, *nutritionist* merekomendasikan peternak menggunakan probiotik sebagai bahan aditif. Probiotik merupakan mikroorganisme yang dapat meningkatkan pertumbuhan dan efisiensi pakan ternak tanpa mengakibatkan terjadinya proses penyerapan komponen probiotik dalam tubuh ternak, sehingga tidak terdapat residu dan tidak terjadinya mutasi pada ternak. Selanjutnya ditambahkan bahwa bakteri probiotik dapat memberikan keuntungan pada kesehatan manusia dan ternak seperti meningkatkan pertumbuhan, meningkatkan produksi susu, dan meningkatkan sistem kekebalan tubuh.

Sekuens 16S rDNA probiotik dalam akuakultur masih merupakan konsep baru pada bidang perikanan, beberapa penelitian sejauh ini masih terfokus pada masalah pengontrolan terhadap penyakit dan keuntungan dalam perbaikan pertumbuhan dari penambahan probiotik. Bakteri probiotik dapat bertahan hidup dalam saluran pencernaan setelah dikonsumsi. Bakteri ini tahan terhadap lisozim (zat pemecah dinding sel bakteri) dan asam empedu sehingga sampai ke usus dalam keadaan hidup, mampu melekat pada sel epithelia, dan menjaga keharmonisan komposisi bakteri saluran pencernaan (Feliatra 2002). Selanjutnya bakteri ini mampu mengatasi intoleransi terhadap laktosa, mencegah diare, sembelit, kanker, hipertensi, menurunkan kolesterol, menormalkan komposisi bakteri saluran pencernaan setelah pengobatan antibiotik, serta meningkatkan sistem kekebalan tubuh (Waspodo 2002). Gen 16S rDNA merupakan komponen penting dalam sel dan sangat menguntungkan di dalam analisis filogenik, karena terdiri dari daerah-daerah yang dikonservasi sehingga mutasi akan terbatas, studi sistematis bakteri pada tingkat famili, genus, spesies, ataupun subspecies (Chen *et al*, 2000).

Brock dan Madigan, (1991), menyatakan bahwa 16S rDNA sangat mudah penanganannya dari pada 23S rDNA, maka 16S rDNA lebih sering digunakan untuk

melihat perkembangan filogenetik prokariota dan beberapa pada eukariota. 16S rDNA terdapat pada semua prokariota dan memiliki bagian atau sekuen konservatif dan sekuen lainnya sangat bervariasi. Sabdono, (2001), menambahkan bahwa sekuen nukleotida 16S rDNA tidak hanya memudahkan pemahaman yang lebih baik pada filogenetik mikroba. Namun juga memudahkan identifikasi bakteri dari sampel lingkungan.

Penerapan filogenetik molekuler pada ekologi mikroba menunjukkan adanya diversitas prokariotik yang terjadi secara alami. Lebih dari 16.000 sekuen gen 16S rDNA dari berbagai spesies bakteri telah disimpan dalam *Gen Bank*. Gen 16S rDNA mempunyai daerah sekuen yang dikonversi, sehingga dapat digunakan untuk menduga hubungan kekerabatan secara alami antar spesies yang mempunyai kekerabatan jauh serta dapat digunakan untuk membedakan spesies yang mempunyai kekerabatan dekat dari berbagai daerah (Rhodest *et al*, 1998). Tujuan penelitian ditemukannya isolat murni bakteri probiotik yang berasal dari saluran pencernaan ikan kerapu bebek asli Indonesia. kedepannya dapat dikembangkan untuk akuakultur di Indonesia, khususnya formulasi pada pakan ikan dengan penambahan bakteri probiotik asli Indonesia sehingga bisa dikembangkan oleh industri pakan sebagai pakan yang berkualitas tinggi.

BAHAN DAN METODA

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September 2006 sampai Desember 2006. Sampel ikan kerapu bebek (*Chromileptes altivelis*) diperoleh Balai Budidaya ikan Batam. Isolasi dan identifikasi bakteri probiotik pada saluran pencernaan ikan Kerapu Bebek dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Riau, sedangkan untuk PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Universitas Diponegoro Semarang. Hasil purifikasi DNA dikirim ke Balai Pengkajian Pengembangan Teknologi (BPPT) Tangerang Jakarta untuk disekuensing.

Bahan-bahan yang digunakan antara lain: media agar non selektif TSA (*Tryptone Soya Agar*), kulturbakteri, aquabides, primer 27 F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) dan 1492 R (TACGGYTACCTTGTTACGACTT), *megamix royal* (MMR), DNA *purification kit*, isopropanol, *loading buffer*,

DNA marker, buffer TAE 1X, agarose gel, ethanol, ethidium bromide.

Metode yang digunakan adalah metode survei, dengan mengamati sel bakteri probiotik pada saluran pencernaan ikan kerapu bebek. Ikan kerapu bebek dibedah secara aseptis untuk diambil organ pencernaannya (lambung dan usus) digerus dan diencerkan dalam larutan pengencer sampai taraf pengenceran yang diinginkan lalu dimasukkan ke dalam larutan fisiologis (NaCl 0,9%) pada pH 2, dengan tujuan hanya bakteri probiotik yang dapat tumbuh dan berkembang pada pH tersebut. Penyimpanan koloni bakteri dilakukan pada suhu 40°C dan siap untuk digunakan pada pengujian selanjutnya setelah diperoleh isoalt murni dilakukan analisis lanjutan yaitu dengan Prosedur yang dilakukan adalah *Freez and Thaw*, *Polymerase Chain Reaction*, Elektroforesis, dan Pengamatan Hasil PCR Pada Gel Agarose, Purifikasi Gel Elektroforesis, Sequensing DNA, Analisis Sequen DNA Isolat Bakteri (Radjasa 2006)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, diperoleh bahwa bakteri yang diisolasi dari usus dan lambung ikan kerapu bebek dapat tumbuh dan berkembang pada media kultur TSA dengan pH 2, yang merupakan indikator utama bakteri probiotik. Koloni bakteri yang tumbuh pada media terdapat dalam berbagai macam bentuk, warna, tepian, ukuran, dan permukaan koloni (elevasi) yang berbeda. Dari hasil pengamatan morfologi ditemukan 6 isolat bakteri pada saluran pencernaan ikan kerapu macan yaitu BPa, BPb, BPc, BPd, BPe, dan BPf. Masing-masing isolat memiliki morfologi yang berbeda satu sama lain. Hasil amplifikasi DNA PCR universal dari ke-6 isolat bakteri dapat dilihat pada gambar 1. Gambar 1 menunjukkan bahwa semua isolat menghasilkan pita tunggal dengan ukuran sekitar 1500 bp (*base pair*) sesuai dengan perbandingan menggunakan marker DNA. Besarnya ukuran ini sesuai dengan ukuran yang diharapkan dari gen-gen 16S rDNA bakteri yaitu 1500-1600 bp.

Sekuensing DNA Isolat Bakteri. Hasil sekuensing 16S rDNA dari masing-masing isolat bakteri dapat dilihat pada Tabel 1.

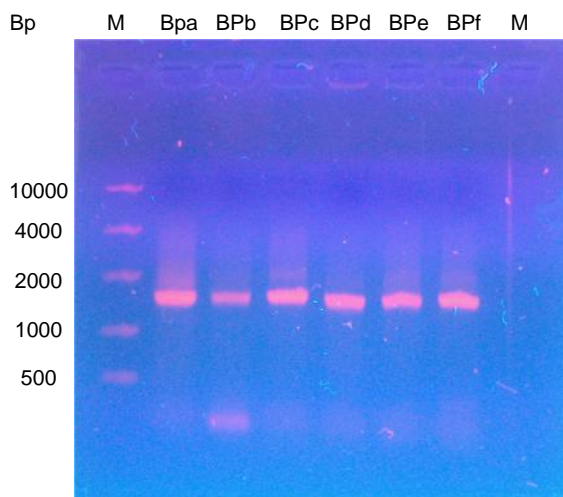
Analisis Sekuen DNA Isolat Bakteri. Hasil penelusuran sekuen masing-masing isolat bakteri dengan sistem BLAST dapat dilihat pada Tabel 2.

Bakteri probiotik adalah bakteri hidup yang diberikan sebagai suplemen makanan yang mempunyai pengaruh yang menguntungkan pada kesehatan baik pada manusia maupun hewan, dengan memperbaiki keseimbangan mikroflora intestinal. Bakteri-bakteri non patogen (probiotik) yang berdomisili di usus terutama usus besar dan mengadakan kolonisasi yang membentuk mikroekosistem yang bermanfaat untuk kesehatan dalam aspek ketahanan infeksi, aspek metabolik dan aspek imunologis.

Dari identifikasi molekuler, bakteri yang terdapat pada saluran pencernaan kerapu bebek didominasi oleh bakteri dari genus *Bacillus* dan diikuti oleh *Vibrio*. Bakteri dari genus *Bacillus* merupakan bakteri probiotik yang sudah banyak dikomersilkan. Irianto (2003), menyatakan bahwa *Bacillus* sp. merupakan bakteri probiotik komersil yang dapat ditebar pada kolam atau tambak. Bakteri ini dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen seperti bakteri *Vibrio harveyi* yang berada di perairan. Selanjutnya dikatakan bahwa tidak

Tabel 1. Hasil sekuensing gen 16S rDNA dari isolat bakteri

Isolat	Sekuen gen 16S rDNA
BP _a	GCTTTGGACCCAAAAAGGGGGTGAAGAAACCTCGCCTGGAAGACTCGGGGTAACCCGGGAAACCGGGGCTAATACC GGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTACAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAG CTAGTTGGTGAGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGGACTGAG ACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGT GAGTATGAAGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTTGGGAAGAACAAGTCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACG GTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTAT TGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAATTGAAAC TGGGGAACCTGATGTCAGAAGAGGAGAGTGAATTCACGCTGATGCGGTGAAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCA GTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGACGAAAAGCGTGGGGGAGCGAACAAGGTTTTGATACC CCGGGTGGT
BP _b	ACTGCCCTGTTCCGAGGCAGGCGGACGGGTGGAGTAATGGCCTAGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAA ACGATGGCTAATACCGCATAATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTG GGATTAGCTAGTTGGTGAGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGA ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCACGCCATG CCGCGTGTGTGAAGAAGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTCAGTCTGAGGAAGGTGGTAGAGTTAATAGCTCCATTATTT GACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCAGGCTAACTCCGTCGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGA ATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTTAA
BP _c	CATTTTACGGGGGGGGCCCGATCCACGCACGTCGAGCGAATGGATAAGAGCTTGGTCTTATGAAGTTAGGGGCCCTTACG GGAGAGTTAACCTGGGTAACTGCCCATAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAA CCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTA ACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGTATCGCCACACTGGGACTGAGACAGCCGACACTGAG CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGTGATGTAAGGCT TTCGGGTCGTAATAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAA GCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGC GCGCAGGTGGTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATGGAACTGGGAGACTTGAGTG CAGAAGAGGAAAGTGAATTCCATGTGAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACA
BP _d	ACAACCTTACGCCAACGTCGCGGAGCGGGAACAAGTGATCTGAACCTTCGGGGAACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGA CGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAACGATGGCTAATACCGCATAATGCCTAC GGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCT CACCAAGGCGACACTCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTACGAGACCGTCCAGACTCCTACGG GAGGCAGCAATGGGGAATTGACACAATGGGCGCAAGCCTGATGACAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGT TGTAAGCACTTTTCAGTCTGAGGAAGGTGGTGGAGTTAATAGCTCTATTATTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACC TAACTCCGTCGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGT GGTTTGTAAAGTACAGTGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTCGGAATAGCACTTTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAG GGGGTGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTATAGACTTACGGGAATACTGGTGG
BP _e	TTCCGGAAGCCGGACACGATGTGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCC TGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGGG GCTTCGGCTACCACTTACGGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCG TAGCCGACTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAA TCTTCCGCAATGGACAAAGTCTGACGGAACAACCGCCGCTGAGTGTGATGAAAGGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGTTA GGGAAGGACAAGTACCGTTGCAATAGGGCGGTTCTTACGGTACCTGACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC TACCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGA TGTGAAAGCCCCGGCTCACCGGGGAGGGTCAATTGAAACTGGGGGAACCTGTGTGCAGAAGAGGAGAGTGGGAATTCC TCCG
BP _f	GCAATTGGGAGCATCGATGTCCGCGCAGCGGAGGACAACACGGGGGCAACCGGCCCTGTTAAACGGGGAGAAGTCCGG GAAACCGGAGGTAATCCCGGATAACATTTCTCTTGGATAACAGAAAATTGAAGGATGGCTTCGGCTATCACTTACAGATG GGTCCCCGGGGCATTATCTCGTTGGGGAGGTAACCGGCTCCAAAAGGACAATGCATAGCCGACGTGAGAGGGGGAGCT CCCACACTGTGACTCAGACACGCCCCACACTCCTCCACGAGGCACCACTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA CATACCACCGCCCGTGTGTGATAAAGGCTTTCCGGGCGTAAACTCTGTTGTTAGCGAAGAAGAGGTACAAGATTACT GCTTGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGC GTTATCCTGAATTATTGGGGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTCT



Gambar 1. Hasil amplifikasi DNA-PCR universal pada gel agarose. Semua band berada di posisi 1500 bp, karena primer yang dipakai untuk PCR 16S universal (targetnya 1500 bp).

Keterangan:

- M = Primer I. 27 F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG)
 BPa = Bakteri Probiotik a
 BPb = Bakteri Probiotik b
 BPc = Bakteri Probiotik c
 BPd = Bakteri Probiotik d
 Bpe = Bakteri Probiotik e
 BPf = Bakteri Probiotik f
 M = Primer II.1492 R (TACGGYTACCTGTACGACTT)

semua dari genus vibrio merupakan bakteri patogen, seperti *Vibrio alginolyticus* merupakan bakteri probiotik yang banyak terdapat pada air laut. Bakteri ini dapat hidup pada saluran pencernaan ikan selama 21 hari pada suhu 15°C. Bakteri ini juga dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen seperti *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio ordalii* dan *Vibrio anguillarum*.

Dari tabel homologi sekuen 16 S rDNA dari masing-masing isolat bakteri dengan sekuen 16 S rDNA dari data base bank diketahui bahwa tidak ada sekuen 16 S rDNA isolat bakteri yang indentik. Hagstrom *et al*, (2000), menyatakan bahwa isolat yang mempunyai persamaan sekuen 16 S rDNA lebih dari 97% dapat mewakili spesies yang sama. Sedangkan persamaan sekuen antara 93-97% dapat mewakili identitas pada tingkat genus tetapi berbeda pada tingkat spesies.

Dari pernyataan tersebut dapat dikatakan bahwa isolat BPa mempunyai kekerabatan dengan *Bacillus velesensis* strain CR-11 pada tingkat spesies karena mempunyai persamaan sekuen 99% sebanyak 638 spesies dari 642 spesies yang telah ditemukan. Isolat BPb mempunyai tingkat kekerabatan spesies dengan *Vibrio alginolyticus* A3G-2 dengan persamaan sekuen 98% sebanyak 643 spesies dari 652 spesies yang telah

Tabel 2. Hasil penelusuran sekuen 16S rDNA isolat bakteri dengan sistem BLAST

Isolat	Hasil Sekuensing	Homologi (%)	No Akses
BPa	<i>Bacillus velesensis</i> strain CR-11	99	AY605932
BPb	<i>Vibrio alginolyticus</i> A3G-2	98	DQ995519
BPc	<i>Bacillus cereus</i> site2S	99	DQ420176
BPd	Uncultured bacterium clone BB3S16S-17	98	EF089472
BPe	<i>Bacillus subtilis</i> strain CICC10066	98	DQ055131
BPf	<i>Bacillus flexus</i> strain LF-3	98	EF127831

ditemukan, isolat BPc mempunyai tingkat kekerabatan spesies dengan *Bacillus cereus* site2S dengan persamaan sekuen 98% sebanyak 658 spesies dari 668 spesies yang telah ditemukan, isolat BPd mempunyai tingkat kekerabatan spesies dengan Uncultured bacterium clone BB3S16S-17 dengan persamaan sekuen 99% sebanyak 636 spesies dari 641 spesies yang telah ditemukan, isolat BPe mempunyai tingkat kekerabatan spesies dengan *Bacillus subtilis* strain CICC10066 dengan persamaan sekuen 98% sebanyak 595 spesies dari 605 spesies yang telah ditemukan, dan isolat BPf mempunyai tingkat kekerabatan spesies dengan *Bacillus flexus* strain LF-3 dengan persamaan sekuen 98% sebanyak 432 spesies dari 485 spesies yang telah ditemukan.

Hasil analisis fragmen DNA hasil amplifikasi PCR menunjukkan bahwa terdapat empat isolat yang mempunyai kekerabatan dekat, yaitu isolat BPa, isolat BPc, isolat BPe, dan isolat BPf yang menunjukkan persamaan pada tingkat genus yaitu *Bacillus*. Sedangkan isolat BPb menunjukkan persamaan pada tingkat genus *Vibrio*.

Setiap spesies bakteri memiliki ciri-ciri molekuler yang dapat membedakannya dari satu spesies dengan spesies yang lain dalam satu genus. Bakteri *Bacillus velesensis* strain CR-11 memiliki ciri-ciri molekuler yaitu terdiri atas 721 pasang basa nitrogen, bakteri *Vibrio alginolyticus* A3G-2 terdiri atas 514 pasang basa nitrogen, bakteri *Bacillus cereus* site2S terdiri atas 694 pasang basa nitrogen, *Uncultured bacterium clone* BB3S16S-17 terdiri atas 694 pasang basa nitrogen, bakteri *Bacillus subtilis* strain CICC10066 terdiri atas 631 pasang basa nitrogen, dan bakteri *Bacillus flexus* strain LF-3 terdiri dari 514 pasang basa nitrogen. Ini

dapat dilihat dari elektroperogram hasil sekuen mesin squencer menggunakan Bigdye V. 3.1.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada ikan kerapu bebek ditemukan 6 spesies bakteri yang berpotensi sebagai probiotik, yaitu *Bacillus velesensis* strain CR-11, *Vibrio alginolyticus* A3G-2, *Bacillus cereus* site2S, Uncultured bacterium clone BB3S16S-17, *Bacillus subtilis* strain CICC10066, dan *Bacillus flexus* strain LF-3. Keenam bakteri ini berpotensi sebagai probiotik karena memiliki ketahanan pada pH 2 yang merupakan indikator utama sebagai bakteri probiotik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pengelola hibah A2 Program Studi Ilmu Kelautan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan UNRI yang sudah mendanai penelitian ini, Dr. Ocki Karna Radjasa dari Universitas Diponegoro Semarang yang sudah banyak membantu, BPPT Serpong Tangerang, dan semua pihak yang sudah membantu terlaksananya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Akbar, S.** 2005. *Meramu Pakan Ikan Kerapu: Bebek, Lumpur, Macan, Malabar*. Cetakan ke-3. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Altsuchul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a New generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Res.* **25**: 3389-3402.
- Brock, T.D. & Madigan, M.T.** 1991. *Biology of Microorganisms*. New Jersey: Prentice Hall Englewood Cliffs.
- Chen, J., Banks, D., Jarret, L., Chang, C.J. & Smith B.J.** 2000. Use of 16S rDNA sequences as signature characters to identify *Xylella fastidiosa*. *Curr. Microbiol.* **40**: 29-33.
- Felliatra.** 2002. Implementasi dan pengembangan bioteknologi kelautan dalam upaya optimalisasi pemanfaatan laut Indonesia. Penguahan Jabatan Guru Besar pada Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Riau, 5 November 2002. Pekanbaru: Universitas Riau. Tidak diterbitkan.
- Griffitns, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C. & Gelbarts, W.M.** 1996. *An Introduction to Genetic Analysis*. New York: W. H. Freeman and Co.
- Hangstrom, A., Pinhassi, J., & Zweifel, U.I.** 2000. Biogeographical diversity among marine bacterioplankton. *Aquatic microbial Ecology.* **21**: 231-244
- Irianto, A.** 2003. *Probiotik Akuakultur*. Yogyakarta: Gajah Mada University press.
- Radjasa, K.O.** 2006. Rapid grouping Of marine psychrotrophic bacteria using restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S. <http://www.karna.radjasa.com>. (15 September 2007)
- Rhodes, A.N., Urbance, J.W., Youga, H., Corlew-Neuman, H., Reddy, C.A., Klug, M.J., Tiedje, J.M. & Fisher, D.C.** 1998. Identification of bacterial isolates obtained from intestinal contents associated with 12.000 years old mastodon remain. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 651-658.
- Sabdo, A.** 2001. *Identifikasi dan Analisis Genetik Bakteri Karang Pendegradasi Senyawa Herbisida 2,4-Diklorofenoksi Asetat di Laut Jawa*. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada Press.
- Waspodo, I.S.** 2001. Efek probiotik, prebiotik, dan sinbiotik bagi kesehatan. <http://www.kompas.com/kompascetak/0109/30/iptek/efek22.htm>. (15 September 2007)