

Pengaruh Ekstrak Bawang Hutan *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. Terhadap Perubahan pH Pada Stimulasi Pertumbuhan Probiotik Secara *In Vitro*

[The Effects Of *Eleutherine Bulbosa* (Mill.) Urb. Extract In Changing The pH In Stimulation Of Growth Of Probiotics In Vitro]

Waode Munaeni^{1*}, Widanarni², Munti Yuhana², Mia Setiawati², Aris Tri Wahyudi³

¹Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Khairun, Jalan Raya Pertamina Gambesi, Ternate, Maluku Utara, Indonesia, 97719

²Departemen Ilmu Akuakultur, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor, Jalan Agatis Kampus Dramaga Bogor, Jawa Barat, Indonesia, 16680

³Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, Jalan Agatis Kampus Dramaga Bogor, Jawa Barat, Indonesia, 16680

*Corresponding author : unalasan@yahoo.co.id; waode.munaeni@unhair.ac.id

ABSTRAK

Bawang hutan *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. merupakan tanaman obat yang memiliki kandungan oligosakarida, berpotensi sebagai prebiotik yang mampu meningkatkan kesehatan usus udang vaname (*Litopenaeus vannamei*). Tujuan dari penelitian ini adalah menguji efek dari ekstrak bawang hutan dengan konsentrasi berbeda terhadap perubahan pH media pada stimulasi pertumbuhan probiotik secara *in vitro*. Konsentrasi ekstrak bawang hutan terdiri dari : 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.313, 0.156 mg/mL. Bakteri probiotik yang digunakan adalah *Pseudoalteromonas piscicida* 1Ub dan *Bacillus* sp. NP5, sedangkan bakteri enterik menggunakan *Vibrio parahaemolyticus*. Waktu inkubasi selama 24 jam dengan pengamatan warna dan pH media dilakukan pada jam ke-0, 14, 18, dan 24. Hasil penelitian menunjukkan bahwa setelah inkubasi selama 24 jam terjadi perubahan warna dan pH media. Nilai pH pada perlakuan probiotik lebih rendah dibandingkan dengan bakteri enterik. Nilai pH pada *P. piscicida* 1Ub lebih rendah dibandingkan dengan *Bacillus* sp. NP5. Perubahan pH yang lebih rendah menandakan probiotik mampu memanfaatkan oligosakarida yang ada pada ekstrak bawang hutan.

Kata kunci : *Eleutherine bulbosa*, oligosakarida, pH, prebiotik, probiotik.

ABSTRACT

Eleutherine bulbosa (Mill.) Urb. is a medicinal plant that contains oligosaccharides, potential as a prebiotic that can improve intestinal health of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. The purpose of this study was to examine the effect of *E. bulbosa* extract with different concentrations of changes in pH parameter of probiotic growth stimulation in the *in vitro* test. The concentration of *E. bulbosa* extract consisted of: 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.313, 0.156 mg/mL. The probiotic bacteria used were *Pseudoalteromonas piscicida* 1Ub and *Bacillus* sp. NP5. The enteric bacteria used was *Vibrio parahaemolyticus*. Incubation time for 24 h with observations starting at 0, 14, 18, and 24 h. The results showed that after 24 h of incubation the bacterial suspension was change in color and pH. The pH value of the probiotic treatment was lower than the enteric bacteria. The pH value of *P. piscicida* 1Ub was lower than the *Bacillus* sp. NP5. The Lower of pH changes indicate that the probiotics is able to utilize oligosaccharides in *E. bulbosa* extract.

Keywords: *Eleutherine bulbosa*, oligosaccharides, pH, prebiotic, probiotic

PENDAHULUAN

Penyakit telah menjadi masalah utama pada akuakultur hingga saat ini (Anderson & Valderrama, 2019). Beberapa pendekatan alternatif telah dilakukan sebagai upaya untuk meningkatkan respons imun dan ketahanan terhadap penyakit seperti probiotik, prebiotik maupun kombinasi keduanya atau disebut juga sinbiotik. Penggunaan aplikasi ini telah diaplikasikan secara luas baik di ikan maupun udang (Dawood *et al.*, 2017). Jenis probiotik seperti *Pseudoalteromonas piscicida* 1Ub dan *Bacillus* sp. NP5 telah terbukti mampu meningkatkan pertumbuhan, respon fisiologi,

kesehatan ikan dan resistan terhadap bakteri patogen penyebab penyakit.

Pseudoalteromonas piscicida 1Ub merupakan probiotik yang diisolasi dari naupli udang vaname (Widanarni *et al.*, 2009), sedangkan *Bacillus* sp. NP5 merupakan probiotik yang diisolasi dari saluran pencernaan ikan nila (Putra *et al.*, 2015). Seperti pada probiotik, peran prebiotik juga memiliki efek menguntungkan pada organisme akuakultur, mampu meningkatkan mikrobiota usus, kinerja pertumbuhan, respons imun, dan ketahanan terhadap penyakit (Song *et al.*, 2014).

Prebiotik merupakan bahan pangan yang dapat tidak dapat dimanfaatkan oleh inang (Carabin *et al.*, 1999), tetapi dapat dicerna atau difermentasi secara selektif oleh mikrobiota dalam saluran pencernaan sehingga memberikan keuntungan pada inang (Gibson *et al.*, 2004). Sumber prebiotik banyak diperoleh pada tanaman, salah satunya adalah bawang hutan *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. Selain memiliki potensi sebagai prebiotik, bawang hutan juga memiliki potensi sebagai antibakteri dan juga antioksidan. Oligosakarida yang ada pada ekstrak bawang hutan meliputi: fruktooligosakarida (10%), rafinosa (7.5%), inulin (2.1%), dan galaktooligosakarida 1%. Ekstrak bawang hutan mampu menstimulasi pertumbuhan *Pseudoalteromonas piscicida* 1Ub dan *Bacillus* sp. NP5 secara *in vitro* (Munaeni *et al.*, 2020a), meningkatkan keragaman mikrobiota di usus pada udang vaname. Selain itu, bawang hutan juga mampu meningkatkan kesehatan usus udang seperti: meningkatkan aktivitas enzim pencernaan (protease, lipase, dan amilase), meningkatkan nilai rasio perimeter dan kerapatan mikrovili usus (Munaeni *et al.*, 2020b) dan meningkatkan total bakteri di usus udang vaname (Munaeni *et al.*, 2020c). Hasil penelitian Phoem & Voravuthikunchai (2013) juga menunjukkan bahwa *E. americana* diduga memiliki potensi sebagai sumber prebiotik mampu menjadi promotor untuk meningkatkan pertumbuhan mikrobiota usus yang di uji pada feses bayi.

Meskipun uji stimulasi pertumbuhan probiotik bawang hutan secara *in vitro* telah dilakukan, namun sejauh ini belum diketahui pengaruh terhadap perubahan pH media dari pertumbuhan probiotik tersebut. Menurut Mariana & Usman (2019), parameter yang dapat digunakan untuk mengukur laju pertumbuhan probiotik dari pemanfaatan prebiotik seperti perubahan pH, menurunnya keasaman, dan total bakteri probiotik. Penurunan nilai pH selama inkubasi/fermentasi mengindikasikan pertumbuhan bakteri yang menggunakan prebiotik sebagai sumber karbon. Aktivitas bakteri menghidrolisis prebiotik menjadi asam laktat menyebabkan penurunan pH (Setiarto, *dkk.*, 2016). Dengan demikian, penelitian ini bertujuan untuk menguji efek dari ekstrak bawang hutan dengan konsentrasi berbeda terhadap perubahan pH pada uji stimulasi pertumbuhan

probiotik *P. piscicida* 1Ub dan *Bacillus* sp. NP5.

BAHAN DAN METODE

Pembuatan ekstrak bawang hutan

Umbi bawang hutan *E. bulbosa* diperoleh dari petani di Desa Kumbewaha, Kabupaten Buton, Provinsi Sulawesi Tenggara, Indonesia. Pembuatan ekstrak bawang hutan menggunakan metode maserasi bertingkat dengan pelarut etanol 96% seperti dijelaskan pada penelitian sebelumnya (Munaeni *et al.* 2017).

Persiapan Bakteri

Bakteri yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari 2 jenis yaitu bakteri probiotik (*Pseudoalteromonas piscicida* 1Ub dan *Bacillus* sp. NP5) dan bakteri enterik (*V. parahaemolyticus*). *V. parahaemolyticus* diperoleh dari Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau dan Penyuluhan Perikanan, Maros, Sulawesi Selatan. Sebelum digunakan untuk uji perubahan warna dan pH, suspensi dari masing-masing bakteri dikultur menggunakan media SWC cair (*sea water complete*: 1 g yeast extract, 5 g bactopecton, 3 mL gliserol, 750 mL air laut, dan 250 mL akuades,) pada suhu 28-29 °C dengan kecepatan 140 rpm selama 18 jam untuk *P. piscicida* 1Ub dan *Bacillus* sp. NP5. Sedangkan *V. parahaemolyticus*, dilakukan uji kurva pertumbuhan *V. parahaemolyticus* terlebih dahulu untuk mengetahui waktu inkubasi yang optimal menggunakan metode spektrofotometri pada absorbansi 600nm.

Perubahan Warna dan pH dari Stimulasi Pertumbuhan Probiotik

Uji perubahan warna dan pH mengacu pada penelitian sebelumnya dari stimulasi pertumbuhan probiotik dari ekstrak bawang hutan (Munaeni *et al.*, 2020a) dengan modifikasi dari (Huebner *et al.*, 2008). Ekstrak bawang hutan dengan perlakuan konsentrasi berbeda mulai dari konsentrasi rendah sampai tertinggi yaitu : A (0.156 mg/mL), B (0.3125 mg/mL), C (0.625 mg/mL), D (1.25 mg/mL), E (2.5 mg/mL), F (5 mg/mL), dan G (10 mg/mL). Masing-masing perlakuan terdapat 3 ulangan. Sebanyak 1 mL dari masing-masing konsentrasi ekstrak bawang hutan ditambahkan pada media SWC cair 10 mL. Perlakuan kontrol menggunakan media SWC saja dengan

volume yang sama dengan perlakuan lainnya. Masing-masing dari suspensi bakteri yang telah dikultur dengan kepadatan 10^8 CFU/mL diinokulasikan ke dalam perlakuan (v/v) sebanyak 5%, kemudian diinkubasi menggunakan shaker dengan kecepatan 140 rpm pada suhu ruang (28-29 °C) selama 24 jam. Pengamatan warna dilakukan sebelum inkubasi dan 24 jam inkubasi. Pengamatan perubahan pH dilakukan pada jam ke-0, 14, 18, dan 24 menggunakan pH indikator.

Analisis Data

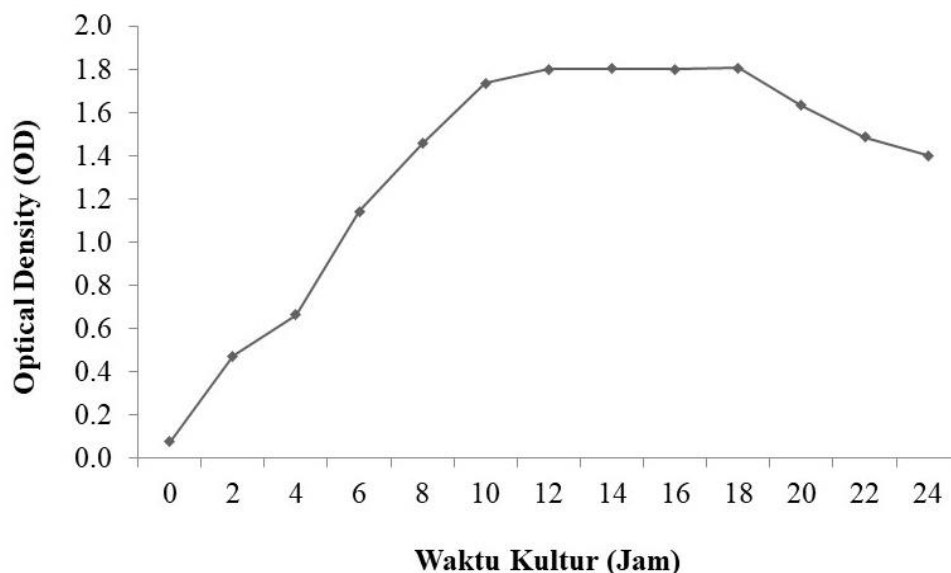
Data pertumbuhan *V. parahaemolyticus* dan perubahan warna dari stimulasi pertumbuhan probiotik dari ekstrak bawang hutan dianalisis secara deskriptif sedangkan parameter perubahan pH dianalisis secara kuantitatif.

HASIL

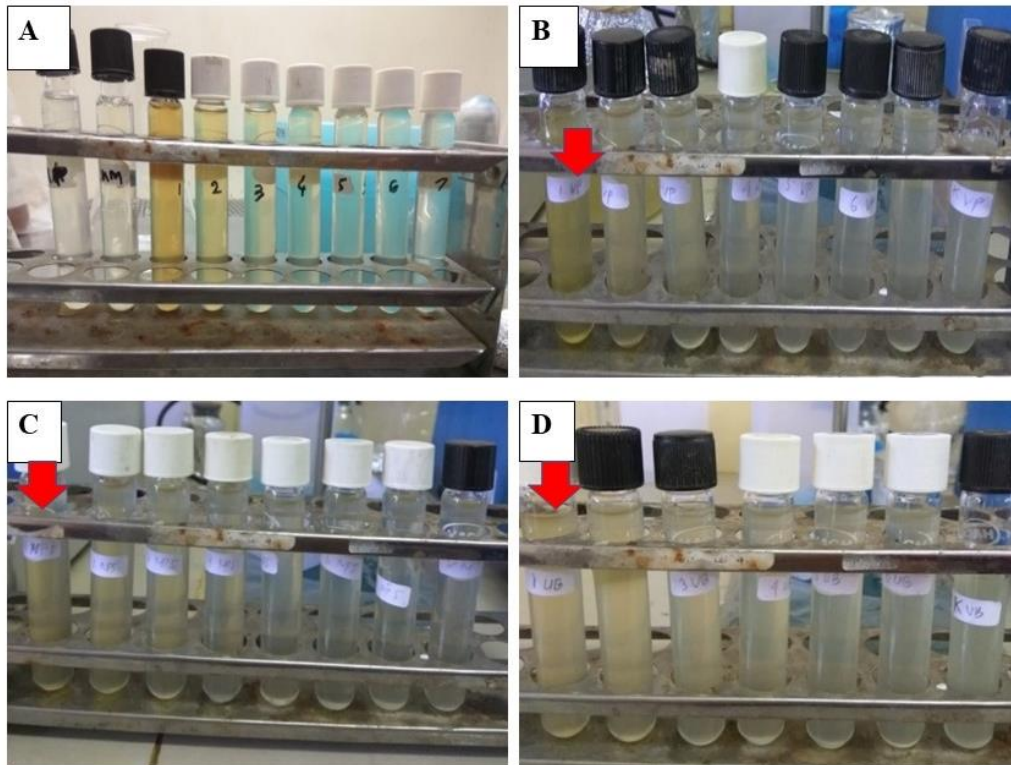
Hasil uji kurva pertumbuhan bakteri enterik menunjukkan bahwa *V. parahaemolyticus* mencapai fase stasioner mulai jam 10 sampai jam 18, kemudian menurun pada jam ke-20 (Gambar 1). Hasil ini kemudian menjadi acuan untuk penggunaan waktu inkubasi pada uji stimulasi pertumbuhan

probiotik dari ekstrak bawang hutan yaitu mulai jam 0, 14, 18 dan 24. Hasil uji stimulasi pertumbuhan probiotik terhadap perubahan warna setelah inkubasi 24 jam menunjukkan adanya perubahan warna. Semakin tinggi konsentrasi, perubahan warna terlihat semakin keruh. Perubahan warna juga terlihat antara bakteri enterik *V. parahaemolyticus* dan probiotik pada konsentrasi yang sama. Probiotik *P. piscicida* 1Ub lebih keruh dan warna ekstrak memudar dibandingkan *Bacillus sp.* NP5.

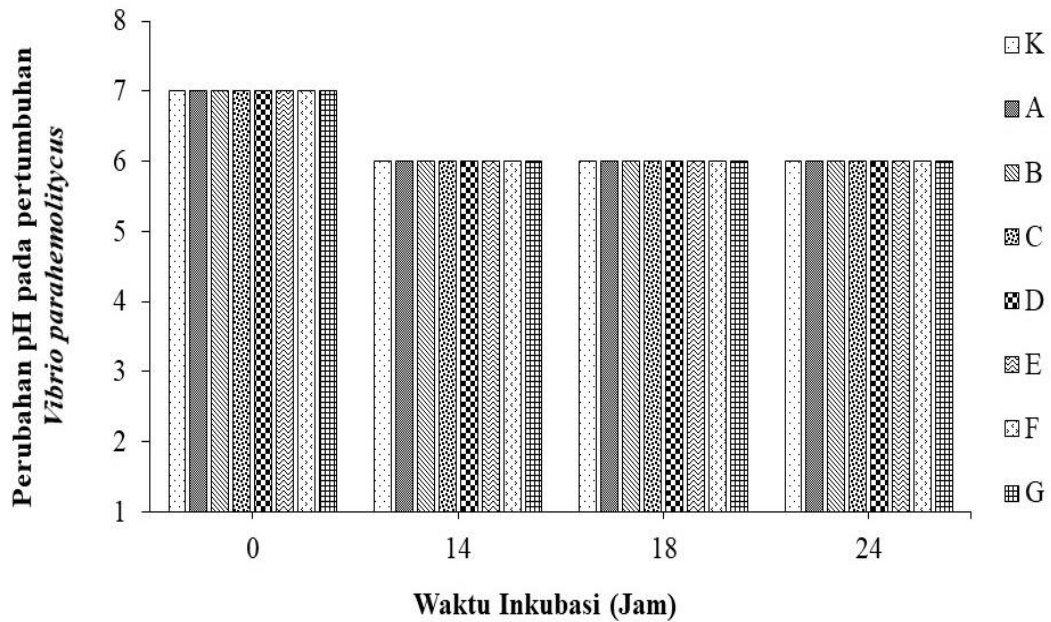
Perubahan pH pada *V. parahaemolyticus* dari jam ke-0 hingga jam ke-14 tidak ada perubahan signifikan, kemudian pada jam ke-14 hingga jam ke-24 tidak terjadi perubahan sama sekali (Gambar 3). Berbeda dengan *V. parahaemolyticus*, perubahan pH terlihat jelas pada *Bacillus sp.* NP5 (Gambar 4) dan *P. piscicida* 1Ub (Gambar 5). Semakin tinggi konsentrasi ekstrak bawang hutan, perubahan pH semakin rendah hingga mencapai pH 5 pada *Bacillus sp.* NP5 sedangkan *P. piscicida* menurun hingga pH 4. Nilai pH *P. piscicida* lebih rendah dibandingkan *Bacillus sp.* NP5 pada konsentrasi dan waktu inkubasi yang sama.



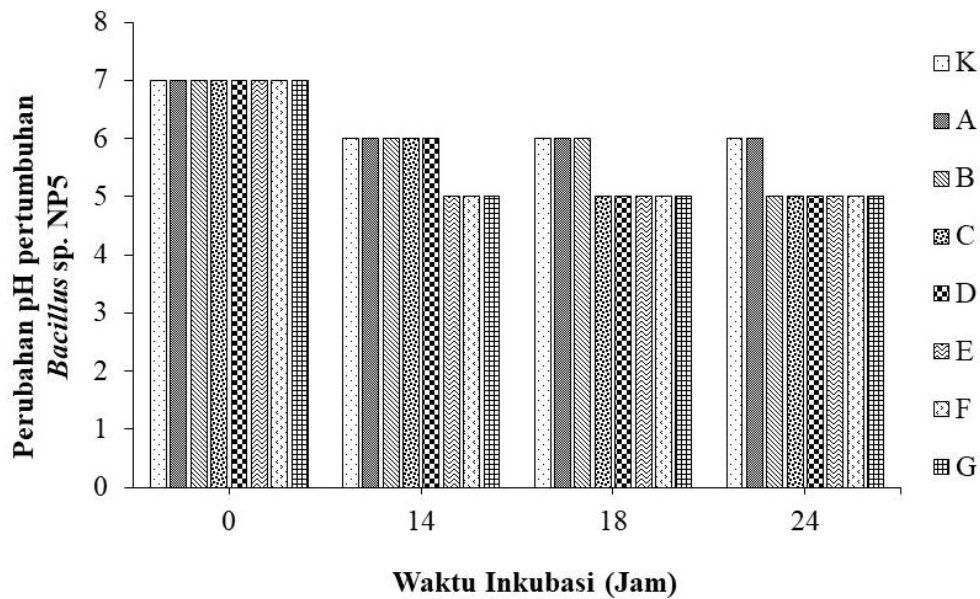
Gambar 1. Kurva pertumbuhan *Vibrio parahaemolyticus*



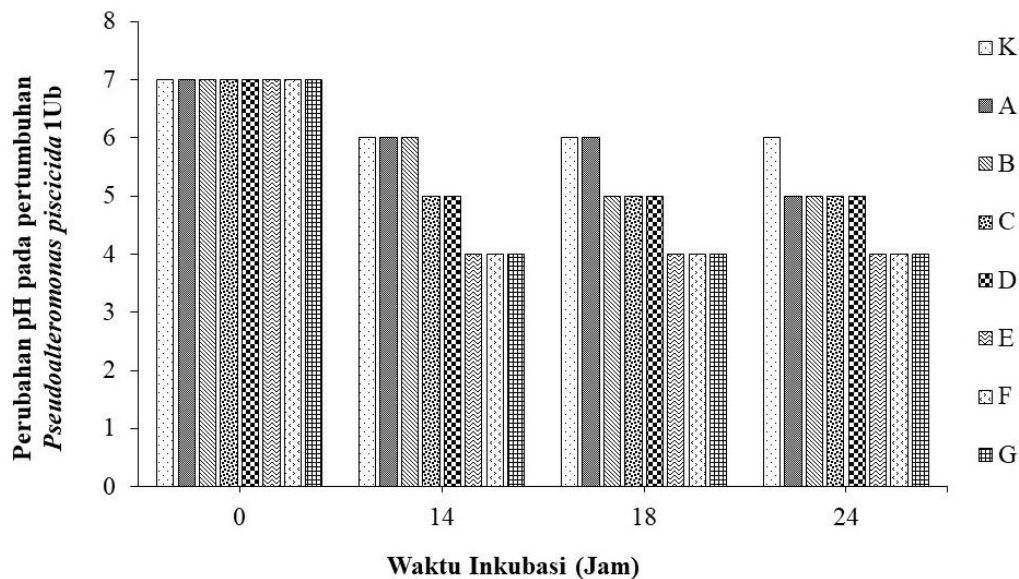
Gambar 2. Perubahan warna dari uji aktivitas ekstrak bawang hutan dengan konsentrasi berbeda terhadap stimulasi pertumbuhan bakteri patogen dan probiotik. Sebelum inkubasi : *V. parahemolyticus* (A); pasca inkubasi 24 jam : *V. parahemolyticus* (B), *Bacillus sp.* NP5 (C), *P. piscicida* 1Ub (D). Tanda panah menunjukkan perbedaan perubahan kekeruhan pasca inkubasi.



Gambar 3. Perubahan pH dari uji aktivitas ekstrak bawang hutan dengan konsentrasi berbeda terhadap stimulasi pertumbuhan *V. parahemolyticus* dengan waktu inkubasi berbeda. A (0.156 mg/mL), B (0.3125 mg/mL), C (0.625 mg/mL), D (1.25 mg/mL), E (2.5 mg/mL), F (5 mg/mL), G (10 mg/mL A).



Gambar 4. Perubahan pH dari uji aktivitas ekstrak bawang hutan dengan konsentrasi berbeda terhadap stimulasi pertumbuhan *Bacillus sp.* NP5 dengan waktu inkubasi berbeda. A (0,156 mg/mL), B (0,3125 mg/mL), C (0.625 mg/mL), D (1.25 mg/mL), E (2.5 mg/mL), F (5 mg/mL), G (10 mg/mL).



Gambar 5. Perubahan pH dari uji aktivitas ekstrak bawang hutan dengan konsentrasi berbeda terhadap stimulasi pertumbuhan *P. piscicida* 1Ub dengan waktu inkubasi berbeda. A (0,156 mg/mL), B (0,3125 mg/mL), C (0.625 mg/mL), D (1.25 mg/mL), E (2.5 mg/mL), F (5 mg/mL), G (10 mg/mL).

PEMBAHASAN

Perubahan pH dan warna atau kekeruhan media hasil penelitian ini menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri dengan memanfaatkan nutrisi yang ada pada media maupun oligosakarida dari ekstrak bawang hutan sebagai sumber karbon. Menurut Sule *et al.* (2014), penurunan pH merupakan salah satu indikator pertumbuhan bakteri. Perubahan pH, menurunnya keasaman, dan total bakteri probiotik merupakan parameter yang digunakan untuk mengukur laju pertumbuhan probiotik. Selama proses inkubasi akan terjadi penurunan nilai pH (Mariana & Usman, 2019). Penurunan pH selama waktu inkubasi menunjukkan adanya proses fermentasi (Mariana & Susanti, 2012). Rendahnya nilai pH pada perlakuan probiotik dibandingkan dengan bakteri enterik pada penelitian ini menunjukkan bahwa probiotik *P. piscicida* dan *Bacillus sp.* NP5 mampu memanfaatkan oligosakarida yang ada pada bawang hutan sebagai sumber karbon. Menurut Setiarto *dkk.* (2016), semakin banyak jumlah inulin sebagai sumber karbon yang dapat dimetabolisme oleh probiotik, maka asam laktat yang dihasilkan juga semakin banyak sehingga menyebabkan pH semakin rendah.

Konsentrasi 0.625 mg/mL (C) dan 1.25 mg/mL (D) dari stimulasi pertumbuhan *P. piscicida* dan *Bacillus sp.* NP5 masih menunjukkan penurunan pH pada jam ke-18 dan 24 sedangkan konsentrasi tertinggi di penelitian ini (E, F, dan G) menunjukkan penurunan terendah pada jam ke-14 dan tidak mengalami penurunan lagi hingga jam ke-24. Penurunan pH pada konsentrasi C dan D diduga tingginya pertumbuhan bakteri yang masih memanfaatkan oligosakarida ketika nutrisi pada media telah habis. Menurut Mariana & Usman (2019), penurunan pH tercepat terjadi dalam 8 hingga 10 jam karena pertumbuhan bakteri pada fase eksponensial. Selama fase eksponensial bakteri mengalami pembelahan sel dengan kecepatan maksimum. Kebutuhan energi pada fase ini cukup tinggi sehingga banyak laktosa dan karbohidrat lain yang difermentasi dan menghasilkan asam, terutama asam laktat. Pemecahan laktosa untuk membentuk asam laktat menyebabkan penurunan pH dari waktu ke waktu (Reza *et al.*, 2016). Perbedaan pH antara perlakuan dibandingkan dengan kontrol kemungkinan

disebabkan oleh kapasitas *buffer* dari komponen media tumbuh (Olson *et al.*, 2012).

Konsentrasi E, F, dan G pada penelitian ini tidak mengalami penurunan setelah jam ke-14. Hal ini diduga disebabkan menurunnya laju pertumbuhan bakteri. Terlihat dari penelitian sebelumnya bahwa pertumbuhan *P. piscicida* dan *Bacillus sp.* NP5 pada konsentrasi 2.5 mg/mL, 5 mg/mL, dan 10 mg/mL pada jam ke-18 dan ke-24 lebih rendah dibandingkan konsentrasi 1.25 mg/mL dan 0.625 mg/mL. Rendahnya pertumbuhan ini karena senyawa metabolit sekunder sebagai antibakteri dari bawang hutan lebih berperan dibandingkan dengan kemampuan oligosakarida. Konsentrasi optimum yang mampu menstimulasi pertumbuhan probiotik adalah 1.25 mg/mL (Munaeni *et al.*, 2020a). Selain itu, lambatnya penurunan pH konsentrasi 1.25 mg/mL dan 0.625 mg/mL diduga karena saat inkubasi jam ke-14 sampai jam ke-18 terjadi stabilitas pH terjadi fermentasi. Hal ini dikemukakan oleh Mariana & Usman (2019), suplementasi *pollard* sebagai prebiotik dengan kadar yang lebih tinggi menyebabkan stabilitas pH pada media fermentasi sehingga proses penurunan pH lebih lambat. Selanjutnya Salovaara (1998) juga menambahkan bahwa protein dan beberapa mineral memiliki kapasitas *buffer* yang tinggi. Kondisi pH yang stabil, pertumbuhan bakteri asam laktat lebih optimal karena terhindar dari adanya *acidity shock*.

Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa kemampuan *P. piscicida* memanfaatkan oligosakarida yang ada pada bawang hutan lebih tinggi dibandingkan dengan *Bacillus sp.* NP5. Terlihat dari perubahan pH yang lebih rendah pada *P. piscicida* dengan konsentrasi dan waktu inkubasi yang sama. Perbedaan ini diduga disebabkan oleh ketersediaan enzim yang ada pada probiotik untuk menghidrolisis oligosakarida yang ada pada ekstrak bawang hutan. Menurut Hamsah *et al.* (2017), *P. piscicida* mampu memproduksi enzim lipase, protease, amilase dan manannase. Keberadaan bakteri menguntungkan pada saluran pencernaan seperti *Pseudoalteromonas sp.* dapat meningkatkan aktivitas enzim pencernaan seperti amilase, tripsin, dan lipase (Amoah *et al.*, 2019). Sedangkan menurut Putra *et al.* (2015), *Bacillus sp.* NP5 mampu memproduksi enzim amilase, protease, dan lipase.

KESIMPULAN

Nilai pH pada perlakuan probiotik lebih rendah dibandingkan dengan bakteri enterik. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak bawang hutan, perubahan pH semakin rendah. Nilai pH pada *P. piscicida* 1Ub lebih rendah dibandingkan dengan *Bacillus* sp. NP5. Perubahan pH yang lebih rendah menandakan probiotik mampu memanfaatkan oligosakarida yang ada pada ekstrak bawang hutan.

REFERENSI

- Amoah, K., Huang, Q.C, Tan, B.P., Zhang, S., Chi, S.Y., Yang, Q.H., Liu, H.Y., Dong, H.Y. (2019). Dietary supplementation of probiotic bacteria, *Bacillus coagulans* ATCC 7050, improves the growth performance, intestinal morphology, microflora, immune response, and disease confrontation of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 87, 796-808. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.029>
- Anderson, J.L., Valderrama, D., Jory, D. (2019). GOAL 2019: Shrimp Production Review. Chennai, India. Oktober 2019. Pp 1-58.
- Carabin, I.G, Gary F.W. (1999). Evaluation of safety of inulin and oligofructose as dietary fiber. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 30(3), 268-282. <https://doi.org/10.1006/rtph.1999.1349>
- Dawood, M.A.O, Koshio, S., Esteba, M.A. (2015). Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture*, 10(4), 950-974. <https://doi.org/10.1111/raq.12209>
- Gibson, G.R., Probert, H.M., Rastall, R.A., Roberfroid, M.B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 17(2), 259-275.
- Hamsah, Widanarni, Alimudin, Yuhana, M., Zairin, M. (2017). The nutritional value of *Artemia* sp. enriched with the probiotic *Pseudoalteromonas piscicida* and the prebiotic mannan-oligosaccharide. *AAFL Bioflux*, 10(1), 8-17.
- Huebner J, Wehling RL, Parkhurst A, Hutkins RW. (2008). Effect of processing conditions on the prebiotic activity of commercial prebiotics. *International Dairy Journal*, 18(3), 287-293. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.08.013>
- Mariana, E., Susanti, H. (2012). Pengaruh suplementasi tepung terigu terhadap pertumbuhan dan laju pengasaman probiotik *Lactobacillus acidophilus*. *Jurnal Teknologi dan Industri Pertanian Indonesia*, 4(3), 14-19. <https://doi.org/10.17969/jtipi.v4i3.738>
- Mariana, E., Usman, Y. (2019). Effect of pollard supplementation on probiotic (*Lactobacillus acidophilus*) growth and acidification rate. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 387, 012028. DOI:10.1088/1755-1315/387/1/012028
- Munaeni, W., Pariakan, A., Yuhana, M., Setiawati, M., Abidin, L.O.B. (2017). In vitro phytochemical and inhibitory potential tests of Buton forest onion extract *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. on *Vibrio harveyi*. *Journal Microbiology Indonesia*, 11(3), 75-80.
- Munaeni, W., Widanarni, Yuhana, M., Setiawat, M., Wahyudi, A.T. (2020a). The potential of Buton forest onion *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. extract as a prebiotic and an antioxidant. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 10(1), 107-111. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2020.10.1.107-111>
- Munaeni, W., Widanarni, Yuhana, M., Setiawat, M., Wahyudi, A.T. (2020b). Impact of dietary supplementation with *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. on intestinal microbiota diversity and growth of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 528, 735466. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735466>
- Munaeni, W., Widanarni, Yuhana, M., Setiawat, M., Wahyudi, A.T. (2020c). Effect in white shrimp *Litopenaeus vannamei* of *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. Powder on immune genes expression and resistance against *Vibrio parahaemolyticus* infection.

- Fish & Shellfish Immunology, 102, 218-227.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.03.066>
- Olson, D.W., Kayanush, A. (2012). Effect of prebiotics on *Lactobacillus acidophilus* growth and resulting pH changes in skim milk and a model peptone system. Journal of Microbial and Biochemical Technology, 4(5), 121-125.
- Putra, A.N., Utomo, N.B.P, Widanarni. (2015). Growth performance of tilapia *Oreochromis niloticus* fed with probiotic, prebiotic and synbiotic in diet. Pakistan Journal Nutrition, 14(5), 263-268.
- Phoem, A.N, Voravuthikunchai, S.P. (2013). *Eleutherine americana* as a growth promotor for infant intestinal microbiota. Anaerobe, 20, 14-19.
<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.01.004>
- Reza, M.A., Hosain, M.A., Lee, L.J., Kim, J.C., Park, S.C. (2016). In vitro prebiotic effects and quantitative analysis of *Bulnesia sarmienti* extract. Journal of Food and Drug an Analysis. 24(4):822-830.
<https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.03.015>
- Salovaara, H. (1998). Lactic acid bacteria in cereal based products. Mc Grawhil Book Co. Inc., New York.
- Setiarto, R.H., Widhyastuti, N., Saskiawan, I., Safitri, R.M. (2016). Pengaruh variasi konsentrasi inulin pada proses fermentasi oleh *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus*. Biopropal Industri, 8(1), 1-17.
<http://dx.doi.org/10.36974/jbi.v8i1.1669>
- Song, S.K., Bo, R.B., Kim D, Park J, Kim J, Kim HD, Ringø E. (2014). Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: A review. Fish & Shellfish Immunology, 40(1), 40-48.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.06.016>
- Sule, J., Korosi, T., Hucker, A., Varga, L. (2014). Evaluation of culture media for selective enumeration of bifidobacteria and lactic acid bacteria. Brazilian Journal of Microbiology. 45(3), 1023-30. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000300035>
- Widanarni, Tepu, I., Sukenda, Setiawati, M. (2009). Selection of probiotic bacteria for biocontrol of vibriosis on tiger shrimp *Penaeus monodon* larvae using co-culture method. Jurnal Riset Akuakultur, 4(1), 95-105.