

KAJIAN AKTIVITAS SENYAWA ANTIBAKTERI *Actinobacillus* sp DARI LARVA IKAN PATIN SIAM (*Pangasius hypophthalmus*) TERHADAP BAKTERI *Aeromonas hydrophilla*

Ardiansyah Kurniawan

Staf pengajar Jurusan Budidaya Perairan Universitas Bangka Belitung

✉ ardian_turen@yahoo.co.id

Abstrak

Kajian aktifitas senyawa antibakteri *Actinobacillus* sp dari larva ikan patin siam (*Pangasius hypophthalmus*) terhadap bakteri *Aeromonas hydrophilla* dilakukan dengan mengisolasi bakteri dari larva ikan patin siam, identifikasi bakteri, pengujian daya hambat terhadap pertumbuhan *Aeromonas hydrophilla* dan analisa senyawa antibakteri pada metabolit *Actinobacillus* sp. Hasil uji penghambatan pertumbuhan menunjukkan bahwa dari 6 isolat bakteri yang diidentifikasi, *Actinobacillus* sp memiliki kemampuan penghambatan yang lebih besar dibandingkan isolat bakteri lainnya. Berdasarkan waktu pertumbuhan bakteri *Actinobacillus* sp, daya hambat terbesar diperoleh pada fase kematian (jam ke-24). Senyawa antibakteri yang terdapat pada metabolit *Actinobacillus* sp berdasarkan hasil analisa GCMS adalah Hexanedioic acid bis (2-ethylhexyl) ester dengan area 24,75%.

Kata kunci : Antibakteri, *Actinobacillus* sp, *Aeromonas hydrophilla*, Larva ikan patin siam.

PENDAHULUAN

Ikan patin siam (*Pangasius hypophthalmus*) sebagai salah satu komoditas perikanan air tawar yang memiliki nilai ekonomis penting menghadapi masalah yang sama dalam pembudidayaannya. Menurut Slembrouck, Komarudin dan Maskur (2005), bakteri patogen utama yang menginfeksi pangasius adalah bakteri *Aeromonas hydrophilla*. Ikan pangasius yang terinfeksi bakteri ini mengalami kondisi perilaku tidak normal, menolak pakan, pendarahan, warna pucat dan sirip terkikis hingga luka pada kulit sampai ke bagian otot.

Bakteri *Aeromonas hydrophilla* umumnya ditemukan di perairan beriklim hangat baik perairan tawar, payau maupun laut. Bakteri ini merupakan bakteri gram negatif yang bersifat heterotropik dan mampu bergerak dengan flagel (White, 2009). *Aeromonas hydrophilla* mampu bertahan hidup pada lingkungan aerob maupun anaerob. *Aeromonas hydrophilla* menyebabkan penyakit bagi ikan dengan memproduksi Aerolysin Cytotoxic Enterotoxin (ACT) yang dapat menyebabkan kerusakan jaringan. (Anonymous, 2009).

Fase larva *Pangasius hypophthalmus* memiliki kondisi yang lemah dengan organ tubuh yang baru terbentuk dan belum sempurna menjadikan fase larva sebagai masa kritis dalam pertumbuhan ikan patin. Menurut Slembrouck, Komarudin dan Maskur (2005), larva ikan *Pangasius hypophthalmus* memiliki panjang 1,6 mm dan bobot 1,5 mg setelah menetas dan mencapai panjang 5 mm setelah berumur 10 hari. Menurut Sularto (2008), larva *Pangasius hypophthalmus* memiliki kuning telur yang

menempel pada bagian perut larva. Kuning telur ini habis setelah berumur 20 jam. Bakteri patogen *Aeromonas hydrophilla* memungkinkan untuk menyebabkan lebih banyak kematian pada ikan patin siam dalam fase larva dibandingkan fase yang lain.

Penanggulangan penyakit akibat *Aeromonas hydrophilla* seringkali dilakukan dengan penggunaan antibiotik. Namun seiring permintaan konsumen untuk menghilangkan penggunaan antibiotik, maka perlu ada alternatif pengganti yang mampu menekan pertumbuhan *Aeromonas hydrophilla* tetapi tidak membahayakan pertumbuhan larva ikan patin. Salah satu alternatif untuk mengontrol bakteri patogen khususnya *Aeromonas hydrophilla* pada budidaya ikan patin adalah dengan menambahkan bakteri antagonistik sebagai bio kontrol.

Penelitian tentang mikroorganisme yang berperan dalam menekan pertumbuhan bakteri patogen diperlukan untuk menanggulangi permasalahan di atas. Untuk kesesuaian dengan pertumbuhan larva ikan patin, maka bakteri penghambat *Aeromonas hydrophilla* di isolasi dari larva ikan patin. Berdasarkan uraian tersebut di atas, maka perlu adanya kajian aktivitas antimikroba pada *Actinobacillus* sp dari Larva Ikan Patin Siam sehingga dapat memberikan informasi penting tentang kemampuannya menghambat bakteri patogen dalam upaya peningkatan hasil produksi ikan patin.

1. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian tersebut di atas, maka perlu dilakukan penelitian untuk menjawab permasalahan berikut :

1. Apakah senyawa anti bakteri dari bakteri *Actinobacillus* sp dari larva ikan patin memiliki aktifitas penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila*?
2. Pada fase apakah *Actinobacillus* sp menghasilkan senyawa anti bakteri yang memiliki daya hambat optimal terhadap *Aeromonas hydrophila*?
3. Bagaimanakah profil senyawa anti bakteri *Actinobacillus* sp?

2. Tujuan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk :

1. Mengetahui aktivitas senyawa antibakteri bakteri *Actinobacillus* sp dari larva ikan patin terhadap pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila*.
2. Mengetahui fase pertumbuhan bakteri *Actinobacillus* sp dari larva ikan patin penghasil senyawa antibakteri dengan kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila* dengan optimal.
3. Mengetahui profil senyawa antibakteri *Actinobacillus* sp yang diisolasi dari larva ikan patin.

3. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan November 2008 sampai dengan bulan Juli 2009 di Laboratorium Mikrobiologi, Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Laboratorium Teknologi Pangan Fakultas Teknologi Pertanian dan Laboratorium Kimia Organik Fakultas MIPA, Universitas Gajah Mada.

5. Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi : Autoclave, GC-MS (Gas Chromatography Mass Spectrometry), Micropipet, Mikrobact, cawan petri, laminar flow, sentrifuge, tabung reaksi, timbangan analitik, erlenmeyer, jarumose, bunsen, shaker inkubator, penyaring, coloni counter, haemocytometer, mikroskop, pinset, triangle, inkubator, ruang coldstorage, pengering vakum.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi : Biakan murni *Aeromonas hydrophila* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, larva ikan patin siam yang

diperoleh dari Loka Riset Pemuliaan dan Teknologi Budidaya Perikanan Air Tawar (LRPTBPAT), Sukamandi, Subang, Media TSA (Tryptone Soy Agar), NB (Nutrien Broth), Aquadest, kertas cakram (paper disc), Tris Cl, Amonium sulfat, alkohol.

5. Metode penelitian Identifikasi Bakteri

Isolat bakteri yang diperoleh akan dilakukan identifikasi berdasarkan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Hold *et al.*, 1994) yang meliputi: pengamatan morfologi koloni, pengamatan morfologi bakteri, pengujian sifat biokimia bakteri, pengujian motilitas dan penghitungan kepadatan isolat bakteri.

Uji penghambatan terhadap bakteri *Aeromonas hydrophilla*

Bakteri-bakteri yang ditemukan dan diisolasi dari larva ikan patin di uji kemampuan penghambatannya terhadap bakteri *Aeromonas hydrophilla* dengan metode cakram. Metabolit ekstraseluler dari bakteri-bakteri yang diisolasi dari larva ikan patin siam, diekstrak melalui 2 cara yaitu menggunakan presipitasi protein dan mikro filter.

Penentuan kurva pertumbuhan

Penentuan kurva pertumbuhan dengan menghitung jumlah bakteri pada jam ke-0 sampai terjadi penurunan jumlah sel mendekati jumlah awal pada setiap 1 jam. Penghitungan jumlah bakteri dilakukan secara keseluruhan (langsung). Penghitungan secara langsung dapat dilakukan secara mikroskopis yaitu dengan menghitung jumlah bakteri dalam satuan isi yang sangat kecil. Alat yang digunakan adalah *Haemocytometer* dan mikroskop.

Penentuan waktu pertumbuhan bakteri dengan daya hambat optimum

Setiap 2 jam setelah bakteri memasuki fase stationer, dilakukan ekstraksi metabolit bakteri *Actinobacillus* sp untuk di uji daya hambat terhadap *Aeromonas hydrophilla* dengan metode cakram. Penghitungan kemampuan penghambatan dari diameter zona bening yang dihasilkan.

Analisa GCMS

Metabolit bakteri *Actinobacillus* sp dengan daya hambat optimal di analisa senyawa kandungannya dengan GCMS. Supernatan metabolit cair di freeze drying dan diencerkan dengan n-hexane. Selanjutnya diinjeksikan pada GCMS untuk mendapatkan kromatogram. Hasil spektro massa disesuaikan dengan data library senyawa kimia.

4. Hasil dan Pembahasan
Identifikasi bakteri

Hasil isolasi dan identifikasi bakteri diperoleh 6 jenis bakteri yaitu *Bacillus megatterium*, *Bacillus mycoides*, *Acinetobacter boumannii*, *Actinobasillus sp*, *Pseudomonas putida* dan *Micrococcus sp*.

Uji penghambatan terhadap bakteri *Aeromonas hydrophilla*

Hasil uji penghambatan metabolit *Aeromonas hydrophilla* menunjukkan proses ekstraksi dengan mikro filter menghasilkan penghambatan lebih besar dibandingkan proses ekstraksi melalui presipitasi protein. Bakteri dengan daya hambat paling besar adalah bakteri *Actinobacillus sp*.

Tabel 1. Hasil uji penghambatan metabolit *Actinobacillus sp* terhadap *Aeromonas hydrophilla*

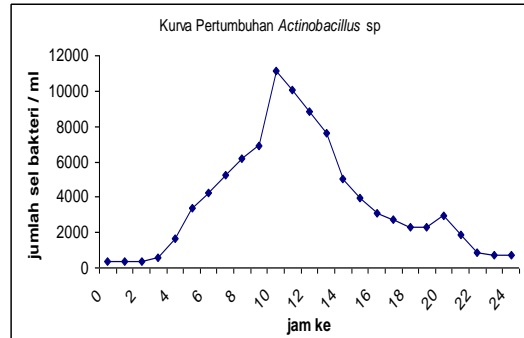
Bakteri Penghasil Metabolit	Presipitasi protein	Micro filter
Kontrol Negatif	6.00	6.00
<i>Bacillus mycoides</i>	6.03	6.03
<i>Bacillus megatterium</i>	6.08	7.18
<i>Micrococcus sp</i>	6.13	8.28
<i>Actinobacter baumannii</i>	6.17	10.32
<i>Pseudomonas putida</i>	6.17	12.36
<i>Actinobacillus sp</i>	6.21	16.14



Gambar 1. Uji daya hambat metabolit isolat bakteri dari larva ikan patin siam dengan metode penyaringan mikro filter terhadap pertumbuhan *Aeromonas hydrophilla*. (1) *Bacillus mycoides* (2) *Bacillus megatterium* (3) *Micrococcus sp* (4) *Acinetobacter baumannii* (5) *Pseudomonas putida* (6) *Actinobacillus sp* (k) kontrol

Kurva Pertumbuhan *Actinobacillus sp*

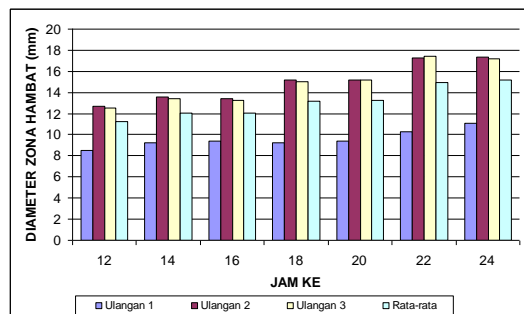
Dari hasil perhitungan jumlah sel bakteri *Actinobacillus sp*, diperoleh grafik pada pertumbuhan bakteri pada gambar 2. Bakteri *actinobacillus sp* memasuki fase log pada jam ke-3 sampai jam ke-10, fase stationer pada jam ke-10 dan memasuki fase kematian pada jam ke-11.



Gambar 2. Kurva pertumbuhan *Actinobacillus sp*

Penentuan waktu pertumbuhan bakteri dengan daya hambat optimum

Diameter zona penghambatan pertumbuhan *Aeromonas hydrophilla* oleh metabolit *Actinobacillus sp* pada fase setelah fase stationer yaitu pada jam ke-12 sampai jam ke-24 adalah berkisar antara 11,26 – 15,20 mm. Semakin lama waktu tumbuh hingga memasuki fase kematian maka semakin besar daya hambat anti bakteri metabolit terhadap pertumbuhan *Aeromonas hydrophilla*. Pada jam ke-24 dihasilkan zona hambat terbesar yaitu rata-rata 15,20 mm. Grafik hasil pengujian daya hambat metabolit *Actinobacillus sp* terhadap *Aeromonas hydrophilla* terlampir pada Gambar 3.



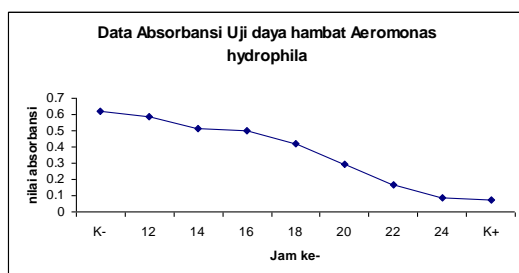
Gambar 3. Grafik penghambatan pertumbuhan *Aeromonas hydrophilla* pada jam ke-12 sampai ke-24

Hasil uji penghambatan pertumbuhan *Aeromonas hydrophilla* oleh antibakteri *Actinobacillus sp* dengan metode pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer ditunjukkan pada Tabel 2 dan Gambar 4. Kontrol negatif berupa media steril tanpa

pemberian *Aeromonas hydrophila* maupun antibakteri *Actinobacillus* sp sebagai pembanding absorbansi tanpa adanya pertumbuhan sel bakteri, sedangkan kontrol positif berupa biakan *Aeromonas hydrophila* pada media tanpa penambahan antibakteri *Actinobacillus* sp sebagai pembanding jumlah sel bakteri *Aeromonas hydrophila* tanpa penghambatan antibakteri.

Tabel 2. Data absorbansi spektrofotometer daya hambat metabolit *Actinobacillus* sp terhadap *Aeromonas hydrophila*

No	Sampel	Absorbansi
1	Kontrol Negatif	0,073
2	Jam ke 24	0,084
3	Jam ke22	0,167
4	Jam ke 20	0,295
5	Jam ke 18	0,421
6	Jam ke 16	0,502
7	Jam ke 14	0,514
8	Jam ke 12	0,586
9	Kontrol Positif	0,617



Gambar 4. Grafik nilai absorbansi spektrofotometer daya hambat antibakteri *Actinobacillus* sp terhadap *Aeromonas hydrophila*

Analisa GCMS

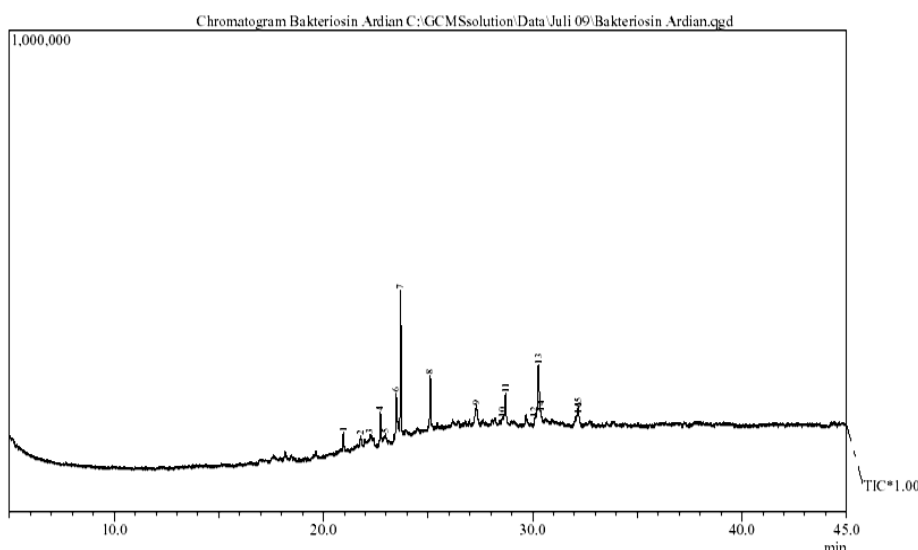
Metabolit dari *Actinobacillus* sp yang memiliki daya hambat terhadap pertumbuhan

Aeromonas hydrophila, di uji jenis-jenis senyawa yang terkandung didalamnya melalui *gas chromatography-mass spectrometry* (GCMS). Sebelum di uji menggunakan GCMS, metabolit bakteri *Actinobacillus* sp di *freeze drying* untuk menghilangkan air dalam metabolit. Menurut Dennison (2002), Freeze drying adalah metode untuk memisahkan air dari sample dengan suhu rendah. Air dikeluarkan langsung dari es (sample beku) melalui penyubliman. Pengurangan air tersebut dapat menghambat reaksi kimia yang menggunakan air sehingga membantu pada proses penyimpanan sample.

Metabolit *Actinobacillus* dalam bentuk kering di uji GCMS dengan menggunakan GCMS tipe GCMS-QP2010S SHIMADZU dengan Kolom HP-5MS, Panjang :30 meter, diameter 0,25 mm, Gas pembawa Helium. Metode yang digunakan adalah Suhu Column Oven 100 °C, Suhu Injection 300 °C, Mode Injection Splitless, Sampling Time 1 menit, Flow Control Mode Pressure, Pressure 22.0 kPa, Total Flow 60.0 mL/min, Column Flow 0.50 mL/min, Linear Velocity 26.3 cm/sec, Purge Flow 3.0 mL/min, Split Ratio 113.0. Hasil pengujian GCMS pada metabolit *Actinobacillus* sp ditampilkan pada Gambar 5.

Hasil GC pada senyawa antibakteri *Actinobacillus* sp menghasilkan 16 puncak. Ke-16 puncak tersebut di spektra massa sehingga dapat diketahui jenis senyawa yang terdapat pada masing-masing puncak dan diketahui senyawa yang berperan dalam penghambatan bakteri *Aeromonas hydrophila*. Hasil pembanding kromatogram GCMS dengan data kromatogram senyawa ditunjukkan pada table 3.

9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester merupakan asam lemak yang termasuk dalam palmitoleic acid (Goren *et al*, 2003). Senyawa ini dapat diproduksi dari derivat asam oleat dan metanol melalui esterifikasi dan dimasa mendatang dapat dimanfaatkan sebagai emulsifier, detegen dan bahan penstabil (Anonymous, 2009).



Gambar 5. Cromatogram GCMS senyawa anti bakteri *Actinobacillus* sp

Tabel 3. Hasil perbandingan kromatogram GCMS dengan data kromatogram senyawa.

Nomor puncak	Waktu retensi (menit)	% area	Prediksi senyawa
1	20,955	2,95	9-OCTADECENOIC ACID (Z)-, METHYL ESTER
2	21,788	1,05	9-OCTADECENAMIDE
3	22,226	3,38	METHOL
4	22,730	6,14	2-PENTADECANONE, 6,10,14-TRIMETHYL
5	22,959	0,84	ALPHA-CEDREN, 2-BROMO
6	23,484	12,36	9-OCTADECENAMIDE
7	23,694	24,75	HEXANEDIOIC ACID, BIS(2-ETHYLHEXYL) ESTER
8	25,109	9,78	1,2-BENZENEDICARBOXYLIC ACID, DIOCTYL ESTER
9	27,312	5,18	CYCLOHEXANE, 1,4-DIDECYL
10	28,542	1,98	1,4-METHANOAZULEN-7-OL
11	28,706	7,86	9-HEPTADECANONE
12	30,100	1,98	2H-3,9A-METHANO-1-BENZOXEPIN
13	30,275	17,62	9-HEPTADECANOL
14	30,400	0,48	PHENOL
15	32,168	2,87	HEXADECANE, 7,9-DIMETHYL
16	32,217	0,79	L-TYROSINE

2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl yang diprediksi merupakan senyawa pada puncak ke-4 asam lemak yang memiliki kemampuan anti mikroba terhadap bakteri gram positif dan gram negatif tetapi tidak memiliki kemampuan sebagai anti jamur. Menurut Yayli *et al* (2005), ekstrak lemak essensial *Minuartia meyeri* memiliki kandungan 2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl sebanyak 5,1%. Ekstrak tersebut mampu menghambat bakteri *Y. pseudotuberculosis*, *E. faecalis* and *S. aureus*, namun tidak mampu menghambat *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens* and *B. subtilis*, serta jamur *C. albicans* and *C. tropicalis*.

Hexanedioic acid bis (2-ethylhexyl) ester pada puncak ke-7 termasuk dalam golongan asam lemak. Senyawa ini memiliki kemampuan antibakteri dimana juga terdapat pada bawang putih jenis *Ophioscordon* dan *Sativum*. Ekstrak kedua jenis bawang putih tersebut memiliki kandungan Hexanedioic acid bis (2-ethylhexyl) ester, 3-deoxy-4-mannoic lactone, thymine dan hexanedioic dan memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexineri* and *Enterobacter aerogenes* (Rajadurai dan Sagar, 2006).

Pada puncak 14 diprediksi merupakan senyawa phenol yang memiliki area 0,48% pada

waktu retensi 30,4 menit. Phenol atau asam karbolat atau benzenol adalah zat kristal tak berwarna yang memiliki bau khas. Rumus kimianya adalah C_6H_5OH dan strukturnya memiliki gugus hidroksil (-OH) yang berikatan dengan cincin fenil. Fenol dapat digunakan sebagai antiseptik seperti yang digunakan Sir Joseph Lister saat mempraktikkan pembedahan antiseptik. Fenol merupakan komponen utama pada antiseptik dagang, triklorofenol atau dikenal sebagai TCP (*trichlorophenol*). Fenol juga merupakan bagian komposisi beberapa anestetika oral, misalnya semprotan kloraseptik (Anonymous, 2009g) Dengan kemampuan tersebut maka phenol dimungkinkan untuk memiliki peran menghambat pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila*

Asam amino yang muncul pada hasil analisa spektro massa adalah L-tyrosine. Tyrosin terdapat pada waktu retensi 32,217 menit dengan luas area 0,79%. Pada sebagian besar mikroorganisme, tyrosine diproduksi melalui prephenate. Prephenate merupakan dekarboksilasi oksidatif dengan retensi dari gugus hidroksi dimana transaminasi menggunakan glutamat sebagai sumber nitrogen untuk menghasilkan tyrosine dan α -ketoglutarate. Menurut Supardjo (2006), bakteriosin merupakan peptida antibakteri yang disintesis secara ribosomal dengan tersusun oleh 30 sampai 60 asam amino. Mekanisme kerja bakteriosin menghambat bakteri lain secara umum dengan menyerang membran sitoplasma melalui pembentukan pori membran sehingga meningkatkan permeabilitas membran

Tyrosin sebagai salah satu jenis asam amino dan terkandung dalam antibakteri yang dihasilkan oleh *Actinobacillus* sp, diprediksi merupakan satu dari asam amino-asam amino yang terdapat dalam senyawa antibakteri tersebut. Hal ini disebabkan tyrosin merupakan asam amino yang kepolarannya paling kecil. Sehingga mampu terdeteksi dengan analisa GCMS. Maka dimungkinkan adanya kemampuan antibakteri seperti bakteriosin dalam antibakteri yang dihasilkan oleh *Actinobacillus* sp dengan tyrosin yang bergabung dengan asam amino lainnya dalam polipeptida.

5. Penutup

Kesimpulan

Bedasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan sebagai berikut:

- Bakteri *Actinobacillus* sp yang diisolasi dari larva ikan patin siam memiliki kemampuan menghambat lebih besar dibandingkan isolat bakteri lainnya terhadap pertumbuhan *Aeromonas hydrophilla* dengan metode penyaringan mikro filter.

- Daya hambat terbesar dari anti bakteri yang dihasilkan *Actinobacillus* sp adalah pada jam ke 24 yaitu pada fase kematian.
- Senyawa antibakteri yang dihasilkan *Actinobacillus* sp yang dimungkinkan menghambat pertumbuhan *Aeromonas hydrophilla* adalah 2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl, Hexanedioic acid bis (2-ethylhexyl) ester, polipeptida dan phenol.

Saran

Dari hasil penelitian ini dapat disampaikan beberapa saran, diantaranya :

- Senyawa antibakteri *Aeromonas hydrophilla* dapat diekstraksi pada jam ke-24 dari pertumbuhan bakteri *Actinobacillus* sp.
- Perlu dilakukan uji pada senyawa anti bakteri dari *Actinobacillus* sp dengan pemisahan senyawa dan penentuan konsentrasi dalam penghambatannya terhadap *Aeromonas hydrophilla* serta penelitian in vivo tentang pengaruh senyawa antibakteri terhadap larva ikan patin baik melalui pemberian kultur bakteri *Actinobacillus* sp maupun pemberian senyawa anti bakteri dari *Actinobacillus* sp

Daftar Pustaka

- Alina A dan Dwi N. Susilowati, 2008. **Aktivitas Penghambatan Bakteriosin dari Aktinomiset terhadap Bakteri Patogen Tanaman Pangan dan Patogen Tular Makanan**. Penelitian Pertanian Tanaman Pangan VOL. 27 NO. 1 2008.
- Anonymous. 2009. **Aeromonas hydrophilla**. Diakses dari www.wikipedia.org pada tanggal 14 februari 2009.
- Anonymous. 2009. **9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester**. Diakses dari www.cemyq.com pada tanggal 19 Agustus 2009.
- Anonymous, 2009. **Phenol**. Diakses dari www.wikipedia.org pada tanggal 19 Agustus 2009.
- Dennison.C, 2002. **A Guide to Protein Isolation**. Kluwer Academic Publisher. New York
- Dirix. G, P. Monsieurs, and B. Dombrecht, 2003. **Peptide signal molecules and bacteriocins in Gram-negative bacteria: a genome-wide in silico screening for peptides containing a double-glycine leader sequence and their cognate transporters** Elsevier. Peptides 25 (2004) 1425–1440
- Harpeni E dan Hasan. 2005. **Eksplorasi Bakteri yang berasosiasi dengan Karang Lunak sebagai Alternatif Sumber Senyawa Bioaktif (Uji Bioassay**

- Antibakteri).** Fakultas Pertanian.
Universitas Lampung.
- Oscarriz dan Pizabarro. 2001. **Clasification and Mode of Action of Membran Active Bacteriocins Produced by Gram Positive Bacteria.** International Microbiologi.
- Slembrouck,J, O. Komarudin, dan Maskur. 2005. **Petunjuk teknis pembenihan ikan patin indonesia, *Pangasius djambal*.** IRD dan Pusat Riset Perikanan Budidaya, Badan Riset Kelautan dan Perikanan.
- Sularto Pamungkas Wahyu, dan Bambang Iswanto, 2008. **Perkembangan Awal Larva Ikan Patin Hasil Persilangan Antara Betina Patin Siam dengan Jantan Patin Jambal.** Loka Riset Pemuliaan dan Teknologi Budidaya Perikanan Air Tawar. Sukamandi. Subang
- Suparjo. 2008. **Bakteriosin dan peranannya dalam ekologi Mikroba Rumen.** Jajo66.wordpress.com. diakses tanggal 24 Februari 2009.
- White.R, 2009. **Diagnosis of Aeromonas hydrophila Infection in Fish.** Animal Disease Diagnostic Laboratory