

# Aktifitas Antibakteri Isolat Bakteri Asam Laktat Saluran Pencernaan Kuda Laut (*Hippocampus kuda* Bleeker, 1852) Terhadap *Vibrio harveyi*

Fionica May Sandi dan Subagiyo\*

Departemen Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro  
Jl. Prof. H. Soedharto, Tembalang, Semarang, 50275  
Email : subagiyo.kelautan13@gmail.com

## Abstract

### **Antibacterial Activity of Lactic Acid Bacteria isolated from digestive tract of seahorse (*Hippocampus Kuda Bleeker, 1852*) Against *Vibrio harveyi***

Seahorses (*Hippocampus kuda*) have high economic value in global trade. Therefore, to meet market demand, cultivation efforts have been carried out. Vibriosis caused by *Vibrio harveyi* is a disease that is often reported to affect seahorses. In this study, lactic acid bacteria were isolated from the digestive tract of seahorses, and were selected based on their antibacterial activity against *V. harveyi*. Antibacterial activity test was carried out by agar diffusion method. Isolates with antibacterial activity were identified based on their morphological and biochemical characteristics. The results of this study obtained 3 (three) LAB isolates that were active against *V. harveyi* from a total of 45 isolates, namely SPKL 34, SPKL 08 and SPKL 58. The SPKL 34 isolate had the highest antibacterial activity. The three isolates were identified as *Lactobacillus* sp

**Keywords:** Lactic acid bacteria (BAL), Seahorse (*Hippocampus kuda*), *Vibrio harveyi*

## Abstrak

Kuda laut (*Hippocampus kuda*) memiliki nilai ekonomi tinggi sebagai salah satu jenis komoditas perdagangan global. Oleh karena itu untuk memenuhi permintaan pasar diantaranya telah dilakukan upaya budidaya. Vibriosis yang disebabkan oleh *Vibrio harveyi* merupakan penyakit yang sering dilaporkan menyerang Kuda Laut. Pada penelitian telah dilakukan pencarian jenis-jenis bakteri asam laktat (BAL) yang berasal dari saluran pencernaan Kuda Laut yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *V. harveyi*. Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar. Isolat yang memiliki aktivitas antibakteri diidentifikasi berdasarkan karakteristik morfologi dan biokimia. Hasil penelitian ini memperoleh 3 (tiga) isolat BAL yang aktif terhadap *V. harveyi* dari total 45 isolat yaitu SPKL 34, SPKL 08 dan SPKL 58. Isolat SPKL 34 memiliki aktivitas yang paling tinggi yaitu dengan rerata luas zona hambat sebesar  $4,14 \pm 0,60$  mm. Hasil identifikasi menunjukkan ketiga isolat merupakan *Lactobacillus* sp. dengan tingkat kemiripan >80%.

**Kata Kunci :** Bakteri asam laktat, Kuda Laut (*Hippocampus kuda*), *Vibrio harveyi*.

## PENDAHULUAN

Kuda laut (*Hippocampus kuda*) merupakan salah satu biota laut yang memiliki nilai komersial tinggi dan banyak diperdagangkan terutama sebagai bahan baku obat tradisional dan ikan hias. Harga seekor kuda laut sebagai ikan hias berkisar Rp30.000,00 - Rp50.000,00 sedangkan harga kuda laut pada pasar online berkisar Rp7.000.000,00/kg berat kering (Setyowati *et al.*, 2018). Database perdagangan CITES selama periode 10 tahun (2008–2018) melaporkan jumlah total global kuda laut kering yang diekspor diperkirakan sebanyak 11.259.098 individu dan jumlah total global kuda laut kering impor diperkirakan mencapai 15.772.838 ekor (Louw dan B rgener, 2020). Indonesia termasuk 6 negara utama pengeksor kuda laut kering ke Hongkong. Data biro statistik Hong Kong yang disitasi oleh Louw dan B rgener (2020) menunjukkan, selama tahun 2008-2018, Indonesia menempati volume 2% dari total kuda laut kering yang diimpor oleh Hongkong. Pemenuhan kebutuhan pasar ini membawa kepada eksploitasi kuda laut yang berlebihan, bersamaan dengan praktik penangkapan ikan yang merusak telah menyebabkan penurunan populasi kuda laut global (Xie *et al.*, 2020 ; Pierri *et al.*, 2022). Oleh karena itu salah satu upaya yang dilakukan untuk menjaga populasi dan kelestarian kuda laut adalah dengan melakukan budidaya (Roza, 2018). Masalah yang muncul dalam budidaya kuda laut adalah serangan penyakit, terutama disebabkan oleh *V. harveyi* (Binh *et al.*, 2016; Qin *et al.*, 2017; Xie *et al.*, 2020).

Populasi bakteri *Vibrio* sp. yang tinggi dapat menjadi ancaman bagi kesehatan dan kelangsungan hidup kuda laut. Raj *et al.*, (2010) menyatakan bahwa kepadatan  $10^4$  CFU/mL bakteri *V. harveyi* sudah dapat menyebabkan kematian kuda laut. Penelitian yang dilakukan oleh Qin *et al.*, (2016), menemukan adanya bakteri *V. harveyi* di setiap kuda laut yang sakit dan merupakan bakteri dominan penyebab penyakit pada kuda laut. Penggunaan bakteri probiotik sebagai agen biokontrol patogen pada budidaya kuda laut menawarkan alternatif untuk menanggulangi masalah penyakit infeksi bakterial tersebut (Allameh *et al.*, 2014).

Probiotik merupakan mikroorganisme yang memiliki kemampuan untuk memodifikasi komposisi bakteri, mampu menghasilkan senyawa antibakteri yang dapat mengendalikan bakteri patogen dan juga mampu menghasilkan enzim ekstraselluler yang dapat membantu proses pencernaan makanan serta pembersihan lingkungan (Lara, 2011). Saat ini probiotik dipercaya sebagai salah satu solusi yang efektif dalam mengendalikan vibriosis pada budidaya perikanan (Yilmaz *et al.*, 2022). Probiotik juga telah terbukti meningkatkan stabilitas gastrointestinal, menghasilkan senyawa antibakteri, bersaing dengan patogen untuk mencegah adhesi di usus, bersaing untuk nutrisi yang dibutuhkan untuk kelangsungan hidup patogen dan menghasilkan efek antifoksin, memodulasi sistem kekebalan tubuh dan mengontrol respons alergi tubuh (El-Saadony *et al.*, 2022). Bakteri asam laktat (BAL) merupakan kelompok bakteri yang selama ini banyak dikembangkan sebagai probiotik (Ringø *et al.*, 2018; Parlindungan *et al.*, 2021), termasuk diantaranya adalah untuk mengendalikan penyakit vibriosis (Thompson, *et al.*, 2022). Oleh karena itu kajian mengenai jenis bakteri asam laktat dalam saluran pencernaan kuda laut untuk dikembangkan menjadi probiotik sangat menarik untuk dilakukan.

## MATERI DAN METODE

Pada penelitian ini BAL diisolasi pada intestinum kuda laut (*Hippocampus kuda*). Bakteri *Vibrio* yang digunakan sebagai bakteri uji adalah *V. harveyi*. *Vibrio* ini diperoleh dari laboratorium Terpadu UNDIP, Semarang, Jawa Tengah. *Vibrio* ditumbuhkan pada medium nutrient agar. Media yang digunakan untuk isolasi BAL adalah medium MRS (*de Man Rogosa Sharpe*) agar. Media untuk uji aktivitas antibakteri *vibrio* adalah medium Nutrient Agar.

Kuda laut yang telah dipuasakan selama 48 jam, untuk membersihkan saluran pencernaan (Mancuso, *et al.*, 2015), dianestesi dengan suhu rendah (Blessing, *et al.*, 2010). Proses isolasi mengikuti Dias, *et al.*, (2019). Permukaan tubuh disterilkan menggunakan alkohol 70% selanjutnya dilakukan pengambilan intestinum secara aseptik menggunakan peralatan seksio steril, intestinum dimasukan kedalam cawan petri steril dan dicuci secara aseptik menggunakan air laut steril, selanjutnya ditiriskan dan ditimbang. Intestinum dihancurkan di dalam lumpang porselin hingga halus. Homogenat diambil dan disuspensikan ke dalam 9 ml air laut steril. Satu ml suspensi homogenat intestinum diinokulasikan ke dalam 9 ml medium MRS cair. Kultur ini kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 48 jam.

Isolasi BAL dilakukan dengan metode *pour plate*. Satu ml kultur bakteri intestinal dalam medium MRS cair diinokulasikan ke dalam 9 ml air laut (70%) steril untuk mendapatkan faktor pengenceran  $10^{-1}$ . Seri pengenceran  $10^{-2}$  dibuat dengan menginokulasikan 1 ml suspensi bakteri pada pengenceran  $10^{-1}$  ke 9 ml air laut steril, demikian seterusnya hingga diperoleh seri pengenceran  $10^{-3}$ . Suspensi bakteri pada pengenceran  $10^{-3}$  diambil sebanyak 100  $\mu$ l di pipetkan ke dalam cawan petri steril, kemudian media MRS agar yang mengandung  $\text{CaCO}_3$  1% dalam kondisi cair dituangkan ke dalam cawan petri dan diratakan. Inkubasi dilakukan secara aerob pada suhu kamar selama 72 jam. Kemudian koloni-koloni bakteri yang tumbuh menghasilkan asam (ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni) diambil menggunakan ose dan digoreskan ke medium MRS agar miring dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu kamar. Isolat selanjutnya dimurnikan dengan metode goresan.

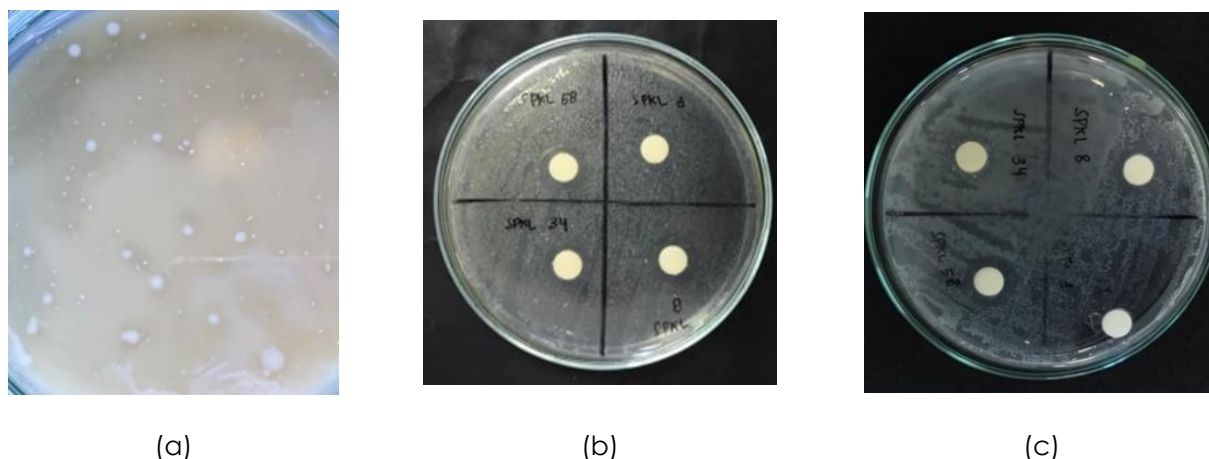
Uji kemampuan BAL menghasilkan senyawa antibakteri terhadap *V. harveyi* dilakukan dengan metode difusi agar (*disk diffusion Kirby and Bauer*) (Payangan *et al.*, 2018). Isolat ditumbuhkan dalam

medium MRS cair selama 24 jam pada suhu ruang. 50 µl kultur isolat dipipetkan ke atas kertas cakram steril (diameter 8 mm) yang kemudian diletakan di atas medium nutrisi agar dalam cawan petri yang telah diinokulasi dengan bakteri uji *V. harveyi*. Kertas cakram yang membentuk zona bening di sekelilingnya menunjukkan adanya aktivitas penghambatan pertumbuhan vibrio. Diameter zona bening yang terbentuk diukur dan digunakan untuk menentukan besarnya aktivitas penghambatan. Pengujian aktivitas antibakteri ini juga dilakukan pada supernatant yang telah dinetralkan nilai pHnya dengan NaOH 1 N. Isolat yang sudah dipastikan memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan *V. harveyi*, dilakukan karakterisasi dan identifikasi berdasarkan sifat biokimiawinya.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil isolasi dan pemurniaan bakteri penghasil asam pada medium MRS agar, diperoleh sebanyak 45 isolat (Gambar 1). Hasil seleksi berdasarkan aktivitas antibakteri terhadap *V. harveyi* didapatkan sebanyak 3 isolat yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi* yaitu SPKL 34, SPKL 58, dan SPKL 08. Hasil pengukuran diameter zona hambat yang terbentuk oleh ketiga isolat BAL itu berturut-turut sebesar  $4,02 \pm 0,80$  mm,  $3,76 \pm 0,65$  mm dan  $4,14 \pm 0,60$  mm (Tabel 1). Hasil pengujian aktivitas antibakteri supernatant kultur yang telah dinetralkan pHnya menunjukkan ke tiga isolat mampu menghambat pertumbuhan *V. harveyi* dengan menghasilkan zona hambat berturut-turut sebesar  $3,55 \pm 0,39$  mm,  $3,02 \pm 0,31$  mm dan  $3,85 \pm 0,40$  mm (Tabel 1).

Bakteri asam laktat dapat menghasilkan asam organik seperti asam propionat, asam format, asam asetat dan asam laktat. Asam organik ini akan menghasilkan kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan bagi pertumbuhan mikrobia pembusuk dan mikrobia patogen (Bangar *et al.*, 2022). Produksi asam dan penurunan pH merupakan mekanisme penghambatan BAL terhadap bakteri gram negative (Kralik *et al.*, 2018). Hasil penelitian Minen dan Boopathy (2011) menunjukkan bahwa asam format memiliki efek penghambatan terkuat terhadap *V. harveyi* diikuti oleh asam asetat, asam propionat, dan asam butirat. Asam laktat dalam bentuk tidak terdisosiasi dapat menembus membran sitoplasma, menghasilkan penurunan pH intraseluler, dan menyebabkan gangguan gradien proton (Lund *et al.*, 2020).



**Gambar 1.** (a) Koloni bakteri penghasil asam, membentuk zona bening pada medium MRS yang diperkaya dengan  $\text{CaCO}_3$ , (b) aktivitas antibakteri kultur isolate SPKL-34, SPKL-58 dan SPKL-08 tanpa netralisasi pH, (c) aktivitas antibakteri kultur isolate SPKL-34, SPKL-58 dan SPKL-08 yang telah dinetralkan pH nya dengan NaOH 1N

**Tabel 1.** Aktivitas antibakteri isolat bakteri penghasil asam terhadap *V. harveyi* yang ditunjukkan

Kode Isolat	Perlakuan	
	Tanpa netralisasi pH	Netralisasi pH
SPKL-34	4,02±0,80	3,55±0,39
SPKL-58	3,76±0,65	3,02±0,31
SPKL-08	4,14±0,60	3,85±0,40

Nilai adalah rerata ± sd dari n=3

Aktivitas antibakteri dalam penelitian ini juga ditunjukkan oleh supernatant kultur isolate bakteri SPKL 34, SPKL 58, dan SPKL 08 yang telah dinetralkan pHnya (Tabel 1). Aktivitas penghambatan ini menggambarkan bahwa ada senyawa antibakteri lain yang mampu menghambat pertumbuhan *V. harveyi* juga dihasilkan oleh ke-tiga isolat bakteri itu. Menurut Farzanfar (2006) dalam review-nya menjelaskan bahwa bakteri asam laktat selain menghasilkan asam organik yang mampu menghambat pertumbuhan mikrobial, juga menghasilkan senyawa antibakteri lain seperti hidrogen peroksida dan bakteriosin. Dalam kondisi aerobik, BAL mensintesis hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) tanpa adanya katalase intraseluler, pseudokatalase, atau peroksidase (Ibrahim *et al.*, 2021).  $H_2O_2$  dapat menghambat pertumbuhan bakteri yang tidak menghasilkan katalase (Vieco-Saiz *et al.*, 2019). Hasil penelitian Ito *et al.*, (2003) menunjukkan akumulasi  $H_2O_2$  dalam suspensi sel efektif menurunkan jumlah bakteri patogen. Bakteriosin adalah zat antimikroba yang berupa polipeptida, atau senyawa mirip protein. Umumnya bakteriosin dapat menyebabkan kebocoran sel yang dapat mengakibatkan kematian sel bakteri (Fauziah *et al.*, 2014). Akan tetapi karena dalam penelitian ini tidak dilakukan pengujian untuk deteksi produksi peroksida atau bakteriosin maka belum dapat dipastikan senyawa non asam dengan aktivitas antibakteri yang dihasilkan ke-tiga isolat BAL apakah peroksida atau bakteriosin atau senyawa lain. Hasil pengukuran diameter zona hambat terhadap kultur bakteri tanpa dinetralkan pHnya dan yang dinetralkan pHnya menunjukkan hasil diameter zona hambat kultur yang tidak dinetralkan pHnya cenderung lebih besar. Asam laktat, selain sifat antimikrobanya karena penurunan pH, juga berfungsi sebagai permeabilizer membran luar bakteri gram negatif dan dapat bertindak sebagai potensiator efek zat antimikroba lainnya (Alakomi *et al.*, 2000).

Identifikasi ke-tiga isolat bakteri penghasil asam dilakukan berdasarkan hasil karakteristik morfologi dan biokimia (Table 2). Tiga isolat tersebut bersifat Gram positif dan memberikan reaksi negatif pada uji katalase. Berdasarkan hasil uji motilitas, ke-tiga isolat bersifat nonmotil. Menurut Ismail *et al.*, (2017) hasil negatif motil jika tidak terdapat pertumbuhan yang berbentuk rambut-rambutan disekitar bekas tusukan jarum ose pada medium. Uji TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*) yang terdiri atas laktosa, glukosa dan sukrosa. Uji TSIA dilakukan untuk mendeteksi bakteri yang dapat memfermentasikan laktosa, glukosa dan sukrosa. Hasil uji TSI menunjukkan ke-tiga isolat mampu memfermentasi gula dengan menghasilkan asam, tetapi tidak menghasilkan gas dan  $H_2S$  Uji LIA (*Lysine Iron Agar*) menunjukkan hasil positif pada isolat dengan kode SPKL 34 dan SPKL 08, hal ini menunjukkan isolat bakteri memiliki kemampuan dalam memecah lisin yang terdapat pada media uji. Uji VP (Voges Proskauer) dilakukan untuk mengetahui pembentukan asetil metil karbinol (aseton) dari hasil fermentasi gula. Hasil uji VP yang didapatkan adalah negative, dengan tidak terjadinya perubahan warna. Pada uji gula-gula, hanya media glukosa dan maltosa yang mengalami pembentukan asam yang ditandai dengan perubahan warna media dari biru menjadi kuning yang artinya bakteri asam laktat membentuk asam dari fermentasi glukosa. Sedangkan kemampuan memfermentasi sukrosa menunjukkan positif untuk isolat SPKL 34 dan SPKL 58, tetapi negatif untuk SPKL 08.

Berdasarkan hasil pengujian sifat Gram dan aktivitas biokimia yang disajikan pada tabel 2. yang dicocokkan dengan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* menunjukkan bahwa ketiga

**Tabel 2.** Karakteristik biokimia isolat bakteri asam laktat dari saluran pencernaan Kuda laut

Karakteristik	SPKL 34	SPKL 58	SPKL 08	Karakteristik <i>Lactobacillus</i> sp. berdasarkan buku acuan
Gram (KOH 3%)	Positif	Positif	Positif	Positif
Katalase	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
Oksidase	Positif	Positif	Positif	Positif
TSIA (Triple Sugar Iron Agar)	A/A, Gas -, H <sub>2</sub> S -	A/A, Gas -, H <sub>2</sub> S -	A/A, Gas -, H <sub>2</sub> S -	A/A, Gas-, H <sub>2</sub> S-
LIA (Lysine Iron Agar)	Positif	Negatif	Positif	Positif
O/F (Uji Oksidatif/Fermentatif)	Fermentatif	Fermentatif	Fermentatif	Fermentatif
Indol	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
Citrat	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
Urea	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
MR (Metil Red)	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
VP (Voges Proskauer)	Negatif	Negatif	Negatif	Positif
Motility	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
Glukosa	Negatif	Negatif	Negatif	Positif
Sukrosa	Positif	Positif	Negatif	Positif
Maltosa	Positif	Positif	Positif	Positif
Laktosa	Positif	Positif	Positif	Positif
Prosentase kesamaan dengan acuan	87,5%	81,25%	81,25%	
Kesimpulan	<i>Lactobacillus</i> sp. <i>Lactobacillus</i> sp. <i>Lactobacillus</i> sp.			

isolat yaitu SPKL 08, SPKL 34 dan SPKL 58 merupakan kelompok bakteri asam laktat yang teridentifikasi dalam genus *Lactobacillus*. *Lactobacillus* SPKL 08, SPKL 34 dan SPKL 58 potensial untuk dikembangkan sebagai probiotik dalam upaya pengendalian vibriosis pada kuda laut yang disebabkan oleh seragan *V. harveyi*. Quinto *et al.*, (2014) dalam review-nya menyebutkan bahwa beberapa spesies *Lactobacillus* telah dilaporkan mempunyai efek probiotik yaitu *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. johnsonii*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. salivarius*, *L. paracasei*, dan *L. elbrueckii subsp. bulgaricus*. *Lactobacillus* juga dapat hidup dalam saluran pencernaan kuda laut. Hasil penelitian Lin *et al.*, (2019) menunjukkan bahwa kuda laut yang sakit enteritis mengalami defisiensi populasi *Lactobacillus* spp dibandingkan yang sehat. Selain itu dalam percobaanya lebih lanjut didapatkan bukti bahwa *Lactobacillus* spp mampu mencegah penyakit enteritis pada kuda laut.

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa bakteri asam laktat merupakan kelompok mikrobia penyusun mikrobiom saluran pencernaan kuda laut. Pada penelitian ini berhasil diisolasi sebanyak 45 isolat bakteri penghasil asam, 3 isolat diantaranya mampu menghasilkan senyawa antibakteri terhadap *V. harveyi*. Hasil identifikasi secara morfologi dan biokimiawi menunjukkan ke-3 isolat adalah *Lactobacillus* sp SPKL 08, *Lactobacillus* sp SPKL 34, dan *Lactobacillus*

sp. SPKL 58. *Lactobacillus* sp ini mampu menghambat bakteri *V. harveyi* melalui mekanisme produksi asam organik dan senyawa antibakteri lain. Mekanisme ditunjukkan dengan terbentuknya zona penghambatan terhadap *V. harveyi* baik oleh supernatant kultur isolat BAL (memiliki pH rendah) maupun supernatant isolat BAL yang telah dinetralkan pH nya (pH 7).

## DAFTAR PUSTAKA

- Alakomi, H. L., Skyttä, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K. & Helander, I.M. (2000). Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and environmental microbiology*, 66(5), 2001–2005. doi: 10.1128/AEM.66.5.2001-2005.2000
- Allameh, S.K., Ringo, E., Yusof, F.M., Daut, H.M. & Ideris, A. (2014). Properties of *Enterococcus faecalis*, A New Probiotic Bacterium Isolated From The Instine of Snakehead Fish (*Channa striata* Bloch). *African Journal of Microbiology Research*, 8(22), 215-2222. doi: 10.5897/AJMR 2013.5830
- Balcázar, J., Loureiro, S., Da Silva, Y. Pintado, J. & Planas, M. (2010). Identification and characterization of bacteria with antibacterial activities isolated from seahorses (*Hippocampus guttulatus*). *Journal Antibiotic*, 63, 271–274. doi: 10.1038/ja.2010.27
- Bangar, S.P., Suri, S., Trif, M. & Ozogul, F. (2022). Organic acids production from lactic acid bacteria: A preservation approach. *Food Bioscience*, 46, 101615. doi: 10.1016/j.fbio.2022. 101615.
- Binh, D.T., Quyen, V.D.H., Sang, T.Q., & Oanh, T.T. (2016). Vibriosis in Cultured Seahorse (*Hippocampus* spp.) in Khanh Hoa Province, Vietnam, *International Journal of Innovative Studies in Aquatic Biology and Fisheries*, 2(2), 43-50
- Blessing, J.J., Marshall, J.C. & Balcombe, S.R. (2010). Humane killing of fishes for scientific research: a comparison of two methods. *Journal of Fish Biology*, 76(10), 2571-2577, doi: 10.1111/j.1095-8649.2010.02633.x
- Dias, J.A.R., Abe, H.A., Sousa, N.C., Silva, R.D.F., Cordeiro, C.A.M., Gomes, G.F.E., Ready, J.S., Mouriño, J.L.P., Martins, M.L., Carneiro, P.C.F., Maria, A.N. & Fujimoto, R.Y. (2019). *Enterococcus faecium* as potential probiotic for ornamental neotropical cichlid fish, *Pterophyllum scalare* (Schultze, 1823). *Aquaculture International*, 27(2), 463-474. doi: 10.1007/s10499-019-00339-9
- El-Saadony, M.T., Swelum, A.A., Abo Ghanima, M.M., Shukry, M., Omar, A.A., Taha, A.E., Salem, H.M., El-Tahan, A.M., El-Tarabily, K.A. & Abd El-Hack, M.E. (2022). Shrimp production, the most important diseases that threaten it, and the role of probiotics in confronting these diseases: A review, *Research in Veterinary Science*, 144, 126-140. doi: 10.1016/j.rvsc.2022.01.009.
- Farzanfar, A. (2006). The use of probiotics in shrimp aquaculture, *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 48 (2), 149–158, doi: 10.1111/j.1574-695X.2006.00116.x
- Fauziah, P.N., Nurhajati, J. & Chrysanti. (2014). Daya Antibakteri Filtrar Asam Laktat dan Bakteriosin *Lactobacillus bulgaricus* KS1 dalam Menghambat Pertumbuhan *Klebsiella Pneumniae* Strain ATCC 70603, CY1538 dan S941. *Majalah Kedokteran Bandung*, 47(1), 35-41.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A.J., Staley, J.T. & Williams, S.T. (1994). *Bergeys manual of Determinative Bacteriology*. Nine edition. Lippicolt Williams and Wilkins, New York.
- Ibrahim, S.A., Ayivi, R.D., Zimmerman, T., Siddiqui, S.A., Altemimi, A.B., Fidan, H., Esatbeyoglu, T. & Bakhshayesh, R.V. (2021). Lactic Acid Bacteria as Antimicrobial Agents: Food Safety and Microbial Food Spoilage Prevention. *Foods*, 10(12), p.3131. doi: 10.3390/ foods10123131
- Ismail, Y.S., Yulvizar, C. & Putriani. (2017). Isolasi, Karakteristik dan Uji Aktivitas Antimikroba Bakteri Asam Laktat dari Fermentasi Biji Kakao (*Theobroma Cacao L.*). *Bioleuser*, 1(2), 45-53.
- Ito, A., Sato, Y., Kudo, S. Sato, S., Nakajima, H. & Toba, T. (2003). The Screening of Hydrogen Peroxide-Producing Lactic Acid Bacteria and Their Application to Inactivating Psychrotrophic Food-Borne Pathogens. *Current Microbiology*, 47, 0231–0236. doi: 10.1007/s00284-002-3993-1
- Koning, S. & Hoeksema, B.W. (2021). Diversity of Seahorse Species (*Hippocampus* spp.) in the International Aquarium Trade. *Diversity*, 13(5), p.187. doi: 10.3390/d13050187
- Kralik, P., Babak, V. & Dziedzinska, R. (2018). The Impact of the Antimicrobial Compounds Produced by Lactic Acid Bacteria on the Growth Performance of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Frontiers in Microbiology*, 9, p.638. doi: 10.3389/fmicb.2018.00638

- Lara, F.M. (2011). The Use of Probiotic in Aquaculture: an Overview. *International Research Journal of Microbiology*, 2(2), 471-478.
- Lin, T., Liu, X., Xiao, D., Zhang, D., Cai, Y. & Zhu, X. (2019). *Lactobacillus* spp. as probiotics for prevention and treatment of enteritis in the lined seahorse (*Hippocampus erectus*) juveniles. *Aquaculture*, 503, 16-25, doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.12.083.
- Louw, S. & Búrgener, M. (2020). Seahorse Trade Dynamics from Africa to Asia, TRAFFIC International, Cambridge, United Kingdom.
- Lund, P.A, De Biase, D., Liran, O., Scheler, O., Mira, N.P., Cetecioglu, Z., Noriega Fernández, E., Bover-Cid S, Hall, R., Sauer, M. & O'Byrne, C. (2020). Understanding How Microorganisms Respond to Acid pH Is Central to Their Control and Successful Exploitation. *Frontiers in Microbiology*, 11, p.556140. doi: 10.3389/fmicb.2020.556140
- Mancuso, M., Rappazzo, A.C., Genovese, M., El Hady, M., Ghonimy, A., Ismail, M., Reda, R., Cappello, S., Genovese, L. & Maricchiolo G. (2015). In Vitro Selection of Bacteria and Isolation of Probiotics from Farmed *Sparus aurata* with Potential for Use as Probiotics. *International Journal of Animal Biology*, 1(4), 93-98
- Mine, S. & Boopathy, R. (2011). Effect of organic acids on shrimp pathogen, *Vibrio harveyi*. *Current Microbiology*, 63(1), 1-7. doi: 10.1007/s00284-011-9932-2.
- Parlindungan, E., Lugli, G.A., Ventura, M., van Sinderen, D. & Mahony, J. (2021). Lactic Acid Bacteria Diversity and Characterization of Probiotic Candidates in Fermented Meats. *Foods*, 10, 1519. doi: 10.3390/foods10071519
- Payangan, G.E., Fatimawali & Rotinsulu, H. (2018). Uji Aktivitas Antimikroba Jamur Laut Yang Berasosiasi Dengan Spons *Phyllospongia lamellose*. *Pharmakon: Jurnal Farmasi Indonesia*, 7(3), 266-275.
- Pierri, C., Lazic, T., Gristina, M., Corriero, G. & Sinopoli, M. (2022). Large-Scale Distribution of the European Seahorses (*Hippocampus Rafinesque*, 1810): A Systematic Review. *Biology*, 11, p.325. doi: 10.3390/biology11020325
- Qin, G., Wang, X., Tan, S. & Lin, Q. (2017). A bacterial infection by *Vibrio harveyi* causing heavy reduction of cultured lined seahorse *Hippocampus erectus*, *Journal of fish diseases*, 40, 601-605, doi: 10.1111/jfd.12533
- Qin, G., Wang, X., Tan, S. & Lin, Q. (2016). A Bacterial Infection by *Vibrio harveyi* Causing Heavy Reduction of Cultured Lined Seahorse *Hippocampus erectus*. *Journal of Fish Diseases*, 40(4), 601-605. doi: 10.1111/jfd.12533.
- Quinto, E.J., Jiménez, P., Caro, I., Tejero, J., Mateo, J. & Girbés, T. (2014). Probiotic Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food and Nutrition Sciences*, 5, 1765-1775. doi: 10.4236/fns.2014.518190
- Raj, S.T., Lipton A.T. & Chanchan, G.S. (2010). Characterization and Infectivity Evaluation of *Vibrio harveyi* causing White Patch Disease among Captive Reared Seahorse (*Hippocampus kuda*). *Journal Marine Science Indian*, 39(1), 151-156.
- Ringø, E., Hoseinifar, S.H., Ghosh, K., Doan, H.V., Beck, B.R. & Song, S.K. (2018). Lactic Acid Bacteria in Finfish—An Update. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1818. doi: 10.3389/fmicb.2018.01818
- Roza, D. (2018). Diagnosa dan Pengendalian Penyakit Infeksi pada Induk Kuda Laut (*Hippocampus kuda*) di Hatchery. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*, 10(2), 353-364.
- Setyowati, D.N., Diniarti, N. & Cokrowati N. (2018). Teknologi Budidaya Kuda Laut Skala Rumah Tangga. *Jurnal Abdi Insani Unram*. 5(1), 46-50.
- Thompson, J., Weaver, M.A., Lupatsch, I., Shields R.J., Plummer, S., Coates, C.J. & Rowley, A.F. (2022). Antagonistic Activity of Lactic Acid Bacteria Against Pathogenic Vibrios and Their Potential Use as Probiotics in Shrimp (*Penaeus vannamei*) Culture. *Frontier Marine Science*, 9, p.807989. doi: 10.3389/fmars.2022.807989
- Vieco-Saiz, N., Belguesmia, Y., Raspoet, R., Auclair, E., Gancel, F., Kempf, I., & Djamel, D. (2019). Benefits and Inputs From Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins as Alternatives to Antibiotic Growth Promoters During Food-Animal Production, *Frontiers in Microbiology*, 10, p.57 doi: 10.3389/fmicb.2019.00057

- Xie, J., Bu, L., Jin, S., Wang, X., Zhao, Q., Zhou, S. & Xu, Y. (2020). Outbreak of vibriosis caused by *Vibrio harveyi* and *Vibrio alginolyticus* in farmed seahorse *Hippocampus kuda* in China, *Aquaculture*, 523, p.735168. doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.735168.
- Yilmaz, S., Yilmaz, E., Dawood, M.A., Ringø, E., Ahmadifar, E. & Abdel-Latif, H.M. (2022). Probiotics, prebiotics, and synbiotics used to control vibriosis in fish: A review. *Aquaculture*, 547, p.727514. doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.737514