

IDENTIFIKASI BAKTERI PENDEGRADASI TAN (*Total Ammonia Nitrogen*) DARI TAMBAK UDANG VANAME DI LAMPUNG TIMUR

Ramaita Ajizah Yuka*, Agus Setyawan, Supono

Program Studi Budidaya Perairan, Jurusan Perikanan dan Kelautan, Universitas Lampung

E-mail : ramaitayuka1@gmail.com

ABSTRACT

The increasing of feeding rate in intensive shrimp farming will be trigger the accumulation of organic matters and toxic compound as a TAN (total ammonia nitrogen) in the pond. One of the effort to reduce the problem is the using of TAN-degrade bacteria. This research aims to identify bacteria that potential able to decrease TAN in laboratory scale. This study was held in November 2019 - March 2020. Twelve isolates of bacteria wich isolated from the shrimp pond sediment in sewage medium at Pasir Sakti, East Lampung. Then the samples will screening to select candidates for TAN degradation bacteria. The selected bacteria with the highest activity in reducing TAN were subsequently identified morphologically including cell shape, Gram test, motility, and molecular identification by 16S rDNA sequence analysis. The result of the research point out that the bacteria that had highest activity to reduce TAN is T4.10 isolate reached 84,6 % (0,478 to 0,074 mg/L). The morphological, biochemical, and BLAST analysis confirmed that the T4.10 isolate was *Bacillus megaterium* bacteria with similarity reached 100 %. These bacteria can be used as bioremediation candidates. Shrimp pond waste will be degraded into compounds that can be reused for shrimp metabolic processes, so the sustainability aquaculture can happened.

Keyword: *Bacillus megaterium*, Bioremediation, Screening, Shrimp Pond, Total Ammonia Nitrogen, 16s rDNA

ABSTRAK

Peningkatan jumlah pemberian pakan pada budidaya udang intensif akan memicu penumpukan bahan organik dan senyawa toksik sebagai TAN (*total ammonia nitrogen*) di dalam tambak. Salah satu upaya untuk mengurangi masalah tersebut adalah dengan penggunaan bakteri pendegradasi TAN. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi bakteri yang berpotensi untuk memulihkan TAN dalam skala laboratorium. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2019 – Maret 2020. Duabelas isolat bakteri hasil isolasi dari endapan tambak udang di Pasir Sakti, Lampung Timur tumbuh pada media *sewage*. Sampel selanjutnya dilakukan penapisan (*skrinning*) untuk memilih kandidat bakteri pendegradasi TAN. Bakteri terpilih yang memiliki aktivitas paling tinggi dalam mereduksi TAN selanjutnya diidentifikasi secara morfologis meliputi bentuk sel, uji Gram, motilitas, dan identifikasi molekuler dengan analisis sekuens 16S rDNA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri yang memiliki aktivitas tertinggi yang mampu mereduksi TAN yaitu isolat T4.10 dengan aktivitas paling tnggi dalam mereduksi TAN adalah isolate T4.10 yang mencapai 84,6% (0,478-0,074 mg / L). Analisis morfologi, biokimia, dan BLAST menunjukkan bahwa isolat T4.10 merupakan bakteri *Bacillus megaterium* dengan kemiripan mencapai 100 %. Bakteri ini dapat digunakan sebagai kandidat bioremediasi. Limbah tambak udang akan diuraikan menjadi senyawa yang dapat digunakan kembali untuk proses metabolisme udang, sehingga dapat terjadi akuakultur berkelanjutan (*Sustainable aquaculture*)

Kata kunci : *Bacillus megaterium*, Bioremediasi, Tambak udang, *Total Ammonia Nitrogen*, 16s rDNA

PENDAHULUAN

Komoditas udang memiliki potensi yang sangat baik untuk dikembangkan sebagai salah satu komoditas andalan pada sektor perikanan budidaya di Indonesia. Total produksi udang Indonesia dalam lima tahun terakhir mengalami peningkatan sebesar 15,7%. Provinsi Lampung tercatat sebagai daerah penghasil udang terbesar di Indonesia. Dari produksi udang nasional yang mencapai 348.100 ton, sebanyak 45% dihasilkan dari wilayah Lampung (KKP, 2018).

Pada kegiatan budidaya, semakin bertambahnya umur udang, maka jumlah pemberian pakan semakin meningkat. Pakan merupakan sumber utama nitrogen karena mengandung protein yang sangat tinggi (>30%). Kandungan protein yang tinggi menyebabkan tingginya limbah budidaya yang bersifat toksik. Limbah tersebut berasal dari sisa pakan, feses dan sisa metabolisme yang dikeluarkan melalui insang. Peningkatan jumlah pakan tersebut mampu memicu peningkatan senyawa yang bersifat toksik bagi udang, seperti amonia (NH_3) dan nitrit (NO_2) (Supono, 2019).

Menurut Kilawati dan Yunita (2014), kadar NH_3 dan NO_2 yang optimal untuk pertumbuhan udang vaname yaitu di bawah 0,01 ppm, sedangkan batas toleransi NH_3 berkisar 0,01-0,2 ppm dan NO_2 berkisar antara 0,01-0,1 ppm. Jika kadar NH_3 dan NO_2 pada tambak budidaya berada di luar nilai optimal, yaitu mencapai 0,968 ppm dan 0,37 ppm, maka akan menyebabkan udang rentan stres sehingga terjadi penurunan imunitas udang dan kematian pada udang. Hal tersebut merupakan salah satu faktor yang menyebabkan kegagalan produksi (Nur, 2011).

Pengolahan limbah amonia dapat dilakukan dengan melibatkan mikroorganisme yang sering disebut bioremediasi. Bioremediasi merupakan sistem pengembalian kondisi lingkungan yang sudah tercemar kembali pada kondisi awal. Secara prinsip, bioremediasi pada tambak udang ialah penambahan mikroorganisme tertentu untuk menormalkan kembali tambak udang yang telah rusak akibat tingginya senyawa metabolitoksik terutama amonia dan nitrit (Badjoeri & widiyanto, 2008).

Bakteri dalam tambak diduga dapat di-

manfaat sebagai bakteri bioremediasi. Berdasarkan Susanti *et al.* 2014), ditemukan tiga isolat bakteri dalam tambak *Penaeus monodon* yang mampu mengurangi kandungan TAN (*total ammonia nitrogen*) antara lain *Campylobacter*, *Listeria*, dan *Nitrosococcus*. Identifikasi bakteri merupakan langkah awal dari rangkaian eksplorasi dan pemanfaatan bakteri *indigenous* suatu daerah. Identifikasi dapat dilakukan secara konvensional melalui karakterisasi biokimia dan mikroskopis sel bakteri, hingga berbasis molekuler.

Eksplorasi dan identifikasi bakteri bioremediasi dapat digunakan sebagai salah satu cara untuk mengenalkan potensi dan keragaman bakteri bioremediasi di wilayah Indonesia. Selain itu dapat menambah koleksi bakteri bioremediasi pendegradasi TAN (*total ammonia nitrogen*) yang berasal dari isolat lokal. Berdasarkan uraian diatas, maka dilakukan identifikasi bakteri bioremediasi dari tambak udang di Lampung Timur. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi, menapis dan mengidentifikasi bakteri bioremediasi pendegradasi limbah tambak udang.

METODE

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2019 - Maret 2020. Pengambilan sampel sedimen tambak dilakukan di tambak udang vaname di Lampung Timur, Provinsi Lampung. Isolasi dan inokulasi bakteri dilakukan di Laboratorium Perikanan dan Kelautan, Fakultas Pertanian Universitas Lampung.

Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian yaitu biakan bakteri, alkohol, media *sewage*, media *nutrient agar* (NA), media oksidatif/fermentatif (O/F), gelatin, media nitrifikasi cair (tanpa bacto agar), KOH 3%, H_2O_2 3%.

Prosedur Penelitian

Pengambilan Sedimen

Sampel yang akan digunakan diambil dari sedimen tambak udang vaname di Desa Mulyosari, Kecamatan Pasir Sakti, Kabupaten Lampung Timur, Provinsi Lampung.

Pengambilan sampel sedimen tambak dilakukan dengan cara mengambil sedimen lumpur menggunakan botol *falcon* pada bagian dasar tambak. Sampel diambil dari satu lokasi tambak yaitu parit tiga.

Sampel diambil sebanyak 5 titik di dalam tambak tersebut. Masing-masing sampel sedimen diambil secara homogen sebanyak 25 µl lalu ditetaskan di atas media sewage. Sampel diratakan menggunakan tangkai gelas penyebar steril. Sampel yang sudah diinokulasi dalam media, kemudian dimasukkan ke dalam kotak pendingin yang bersuhu $\pm 4^{\circ}\text{C}$. Kemudian akan diuji lanjut di Laboratorium Budidaya Perikanan, Fakultas Pertanian Universitas Lampung.

Isolasi Bakteri

Sampel dalam media Sewage (Tabel 3) diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang (28°C - 30°C). Koloni yang terpisah dengan penampilan yang berbeda digoreskan ke media *nutrient agar* (NA) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 28°C - 30°C . Koloni yang tumbuh terpisah dimurnikan kembali pada media yang sama sampai diperoleh koloni tunggal yang murni (Pelczar dan Chan, 2005).

Tabel 1 Komposisi Media Sewage (Rodina, 1972 ; Susanti 2014)

Bahan	Jumlah (g/L)
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	13,5
KH_2PO_4	0,7
$\text{MgCl}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0,1
NaHCO_3	0,5
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,014
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,18
NH_4Cl	0,1
EDTA	0,2
<i>Bacto Agar</i>	15

Penapisan Bakteri Pendegradasi Total Ammonia Nitrogen (TAN)

Isolat yang terpilih dalam media NA miring ditumbuhkan dalam media TSB. Suspensi bakteri dari TSB sebanyak 4 ml dimasukkan ke dalam 100 ml media nitrifikasi cair dalam erlenmeyer volume 250 ml, lalu diinkubasi selama 96 jam di atas inkubator bergoyang (*Rotary shaker*) dengan kecepatan 80 rpm, pada suhu ruang (28°C - 30°C). Analisis kadar TAN dilakukan dengan terlebih dahulu menyaring sampel dengan kertas saring steril

Whatman Cellulose Nitrate (WCN) nomor 7140104 dengan *mess size* 0,45 µm, diameter 47 mm. Pengukuran kandungan TAN dilakukan pada interval waktu yaitu 0, 1 dan 4 hari. Hal ini dilakukan untuk mengetahui waktu tercepat untuk menurunkan kadar TAN. Filtrat dianalisis dengan metode *phenate* dan diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 625 nm (Clesceri *et al.*, 1989; APHA, 2005).

Identifikasi Bakteri

a. Identifikasi Morfologi

Karakteristik bakteri secara morfologi dapat diamati secara makroskopis. Secara visual dapat diamati karakteristik dari koloni bakteri meliputi : bentuk koloni, elevasi, bentuk tepi, pertumbuhan pada media miring (Susanti *et al.*, 2014).

b. Uji Gram dengan KOH 3%

Uji Gram bertujuan untuk menentukan apakah bakteri tersebut termasuk di dalam kelompok bakteri Gram positif atau kelompok bakteri Gram negatif. Uji Gram dengan KOH ini dilakukan dengan mengambil 1-2 ose bakteri yang berumur 18-24 jam dan meletakkannya di atas gelas preparat. kemudian isolat ditetesi KOH 3% sebanyak 1- 2 tetes dan dicampur-ratakan. Setelah itu, tusuk gigi steril ditempelkan pada campuran tersebut dan diangkat secara perlahan. Apabila terbentuk benang lendir atau viscus yang tidak terputus, maka bakteri yang dibiakkan merupakan bakteri gram negatif, namun apabila tidak terbentuk, maka bakteri tersebut termasuk bakteri gram positif (Suslow *et al.*, 1982).

c. Uji Motilitas

Uji motilitas yaitu untuk melihat pergerakan dari bakteri. Pergerakan bakteri dapat dilihat dengan adanya kekeruhan di sekitar tusukan pada media. Uji motilitas dilakukan dengan mengambil satu ose bakteri ditanam secara tegak lurus di tengah media SWC (*Sea Water Complete*) semi solid. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Uji positif ditandai dengan pertumbuhan bakteri yang menyebar, maka bakteri tersebut bergerak (*motil*) dan bila pertumbuhan bakteri tidak menyebar hanya berupa satu garis, maka bakteri tersebut tidak

bergerak (*non motil*) (Sudarsono, 2008).

d. Uji O/F (Oksidatif/Fermentatif)

Uji O/F bertujuan untuk mengetahui sifat aerob atau anaerob bakteri. Masing-masing bakteri diinokulasikan pada 5 ml media oksidatif/fermentatif sebanyak 2 tabung reaksi untuk setiap isolat. Satu ose bakteri ditusukkan pada masing-masing media tersebut, pada tabung 1 ditutupi dengan minyak parafin sebanyak 1 ml, sedangkan pada tabung 2 tidak ditutupi dengan minyak parafin. Selanjutnya bakteri diinkubasi selama 24-48 jam dan diamati perubahan warna yang terbentuk. Apabila terjadi perubahan warna dari hijau menjadi kuning pada kedua media (dengan atau tanpa parafin), hal ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut bersifat oksidatif dan fermentatif. Jika perubahan warna menjadi kuning hanya pada tabung yang diberi minyak parafin maka bakteri tersebut bersifat fermentatif. Sebaliknya jika terjadi perubahan warna kuning hanya pada tabung yang tidak diberi minyak parafin, hal ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut bersifat oksidatif (Masnilah *et al.*, 2013).

e. Uji Katalase

Uji katalase bertujuan untuk mengetahui sifat bakteri dalam menghasilkan enzim katalase. Cara kerja dari uji katalase yaitu dilakukan diatas kaca preparat dengan cara satu tetes H₂O₂ 3% dicampurkan dengan isolat bakteri. Hasil positif ditandai dengan adanya gelembung gas, sedangkan hasil negatif tidak ada gelembung gas (Hadioetomo, 1990).

f. Identifikasi Bakteri Secara Molekuler

Identifikasi bakteri secara molekuler dilakukan dengan cara mengirim isolat murni ke PT.INDOLAB UTAMA. Sekuensing dilakukan perbandingan dengan data-base nukleotida menggunakan program *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) secara *online* melalui situs www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/. Hasil analisis BLAST menunjukkan nama bakteri dan tingkat kesamaan urutan nukleotida dari rRNA isolat dengan urutan nukleotida dari spesies bakteri yang sesuai dalam database *Gene Bank*.

Analisis Data

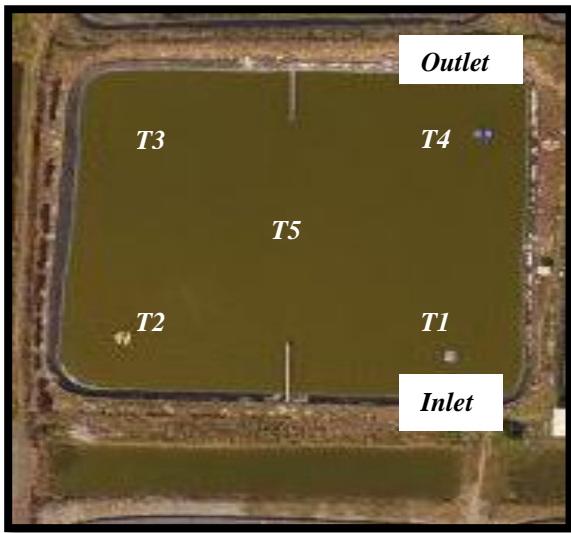
Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode penelitian deskriptif. Analisis data kualitatif adalah analisis data yang digunakan oleh penulis untuk menafsirkan informasi data berdasarkan hasil penelitian yang berbentuk pen-jelasan. Semua data yang diperoleh ditabulasi menggunakan Microsoft Excel 2010 dan disajikan secara deskriptif. Analisis data sekuensing 16S rRNA dilakukan dengan mencocokkan dengan data di *gene bank* www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ yang akan menunjukkan kekerabatan spesies tersebut secara genetik (*Phylogenetic Tree*).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi bakteri yang tumbuh di media nitrifikasi

Lokasi pengambilan sampel berada di Desa Mulyosari, Kabupaten Lampung Timur, Provinsi Lampung. Sampel diambil pada satu kolam tambak udang vaname seluas 2200 m², dengan kedalaman 120-150 cm, dan dasar kolam tambak lumpur berpasir. Tambak ini merupakan jenis tambak intensif (padat tebar tinggi) dengan kepadatan 118 ekor/m². Produktivitas tambak tempat pengambilan sampel bersifat stabil dengan SR 75-85 % per siklus, dengan hasil panen mencapai 1,6-2 Ton per siklus.

Pengambilan sampel sedimen dilakukan pada 5 titik yang diberi kode T1, T2, T3, T4 dan T5. Pada titik T1 lokasinya dekat dengan saluran pemasukan air (*inlet*), T4 lokasinya dekat dengan saluran pembuangan (*outlet*), titik T2 dan T3 berseberangan dengan T1 dan T4, sedangkan T5 berada di tengah tambak. Tambak tersebut didalamnya terdapat 2 kincir yang digunakan yaitu di titik T2 dan T4 (Gambar 2).



Gambar 1 Lokasi pengambilan sampel sedimen

Isolasi bakteri dipilih dari sedimen tambak yang mampu tumbuh di media sewage (simulasi media TAN) adalah sebanyak 12 isolat (Tabel 3). Isolat paling banyak tumbuh terdapat pada titik T4 (Tabel 4). Hal tersebut diduga karena T4 berada di bagian *outlet* (saluran pembuangan air). *Outlet* dibuat lebih rendah dari dasar tambak untuk memudahkan dalam proses pemanenan dan menekan biaya produksi. Hal tersebut menyebabkan *outlet* mempunyai akumulasi bahan organik dan anorganik yang lebih banyak dibandingkan T1, T2, T3, dan T5.

Tabel 2. Jumlah isolat bakteri yang dipilih dari lokasi pengambilan sampel

Pengenceran	T1	T2	T3	T4	T5	Jumlah bakteri
10 ⁰	2	1	3	4	2	12

Bahan organik merupakan sumber utama karbon dan energi untuk pertumbuhan bakteri (Artha *et al.* 2019). Akumulasi bahan organik yang tinggi dapat menyebabkan kandungan nitrogen menjadi tinggi. Senyawa tersebut akan dimanfaatkan oleh bakteri sebagai sumber energi untuk metabolisme pembentukan sel (Bothe *et al.*, 2000). Meningkatnya limbah organik dapat meningkatkan jumlah bakteri seiring dengan ketersediaan oksigen di dalam tambak (Putra *et al.*, 2015).

4.2. Uji Pendegradasi TAN (*Total Ammonia Nitrogen*)

Isolat bakteri yang tumbuh pada media nitrifikasi selanjutnya diuji aktivitasnya dalam mendegradasi TAN. Berdasarkan uji yang telah dilakukan, semua isolat bakteri dapat menurunkan kandungan TAN (Tabel 4). Isolat terbaik yang mampu menurunkan kandungan TAN adalah isolat dengan kode T4.10. Isolat tersebut mampu menurunkan TAN sebanyak 0,404 mg/L. Konsentrasi awal TAN pada isolat T4.10 sebesar 0,478 mg/L. Kemudian, di hari ke-1 turun menjadi 0,154 mg/L dan terus menurun sampai hari ke-4 yaitu menjadi 0,074 mg/L (Tabel 5). Penurunan konsentrasi TAN tersebut diduga karena akumulasi NH₄⁺ digunakan oleh bakteri sebagai nutrisi untuk perkembangan metabolisme pertumbuhannya.

Tabel 3 Nilai Pengukuran TAN

Titik	NO	Nilai TAN (mg/L)			
		H-0	H1	H4	selisih
1	1	0,478	0,297	0,285	0,193
	2	0,478	0,399	0,192	0,285
2	3	0,478	0,183	0,181	0,297
	4	0,478	0,331	0,103	0,375
3	5	0,478	0,378	0,204	0,274
	6	0,478	0,285	0,119	0,359
4	7	0,478	0,157	0,077	0,401
	8	0,478	0,387	0,194	0,284
5	9	0,478	0,274	0,192	0,285
	10	0,478	0,154	0,074	0,404
5	11	0,478	0,319	0,204	0,274
	12	0,478	0,240	0,086	0,392

Keterangan : H0 : Pengujian TAN hari ke-0
H1: Pengujian TAN hari ke 1
H4: Pengujian TAN hari ke 4

Hasil pengujian TAN menunjukkan ada dua isolat yang memiliki bioaktivitas terkuat dalam menurunkan kadar TAN yaitu T4.7 dan T4.10 dengan selisih penurunan TAN mencapai 0,401 mg/L (83,9 %) dan 0,404 mg/L (84,6 %). Hasil tersebut lebih besar dibanding Susanti *et al.* (2014), dimana isolat terbaik yang diperoleh dari tambak udang *Penaeus monodon* menunjukkan kemampuan mendegradasi senyawa TAN sebesar 60 %. Isolat T4.10 juga memiliki efektivitas yang lebih baik dibanding Luo *et al.*, 2016 yang mengisolasi bakteri dari kolam teknologi bioflok ikan mas. Bakteri tersebut hanya mampu menurunkan TAN sebesar 64 %. Isolat terbaik pada penelitian ini

selanjutnya dilakukan identifikasi, namun dari kedua isolat tersebut hanya satu yang dilanjutkan untuk diidentifikasi yaitu Isolat T4.10.

4.3. Identifikasi Bakteri

4.3.1. Identifikasi Morfologi dan Biokimia

Kandidat isolat bakteri yang mampu menurunkan nilai TAN terbaik diidentifikasi secara konvensional menggunakan referensi *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Isolat T4.10 diidentifikasi sebagai genus *Bacillus* karena berelevasi timbul, Gram positif, Motil (dapat bergerak), bersifat oksidatif/fermentatif dan katalase positif (Tabel 6). Genus *Bacillus* termasuk spesies yang hidup bebas (non parasitik) dan patogen parasitik. Dalam kondisi lingkungan yang tidak mendukung, *Bacillus* dapat menghasilkan endospora berbentuk oval yang memungkinkan mereka berada dalam keadaan tidak aktif untuk jangka waktu lama.

Tabel 4. Identifikasi Morfologi dan Biokimia Isolat T4.10

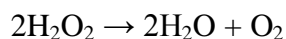
NO	Karakteristik	T4.10	<i>Bacillus</i> (Maudy, 2019)
1	Elevasi	Timbul	Timbul
2	Gram	Positif	Positif
3	Motilitas	Motil	Motil
4	Katalase	Positif	Positif
5	Oksidatif/ Fermentatif	Oksidatif	Oksidatif

Berdasarkan pada tabel 6 dapat dilihat bahwa isolat T4.10 memiliki elevasi timbul yaitu koloni yang memiliki ketinggian nyata terlihat namun rata pada seluruh permukaan (Lampiran 1). Hasil uji Gram (KOH 3%) menunjukkan bahwa isolat tersebut termasuk dalam gram positif, hal ini ditandai dengan tidak adanya filamen seperti benang yang terbentuk setelah ditetesi dengan KOH 3% (Lampiran 2). Penggunaan metode Gram menggunakan KOH disebabkan lebih mudah dan praktis dibanding prosedur pewarnaan Gram.

Bakteri Gram positif memiliki dinding sel yang tebal dan lemak yang tipis sedangkan Gram negatif memiliki lemak tebal dan berdinding sel tipis yang berada di ruang

periplasma. KOH akan menyerang lemak (*bilayer lipid*) dan membuat sel bakteri Gram negatif pecah sedangkan Gram positif tidak terpengaruh. Bakteri Gram positif memiliki struktur dinding sel dengan kandungan peptidoglikan yang tebal, sedangkan bakteri Gram negatif memiliki struktur dinding sel dengan kandungan lipid yang tinggi (Devita, 2016).

Hasil uji katalase yang telah dilakukan menunjukkan hasil positif (lampiran 3). Hal ini ditandai dengan adanya gelembung-gelembung gas pada isolat T4.10 yang ditetesi H₂O₂ 3% dimana mengindikasikan bahwa isolat tersebut merupakan bakteri penghasil katalase, yaitu bakteri yang dapat menghasilkan enzim katalase. Gelembung-gelembung gas O₂ pada isolat T4.10 timbul setelah 5 detik. Hidrogen peroksida (H₂O₂) dapat terdekomposisi oleh enzim katalase yang dapat dihasilkan suatu mikroorganisme (Suhartanti, 2010).



Katalase merupakan enzim yang dapat mengkatalisis penguraian hidrogen peroksida (H₂O₂) menjadi air dan O₂. Hidrogen peroksida bersifat toksik terhadap sel bakteri karena bahan ini mampu menonaktifkan enzim dalam sel dan sangat berbahaya bagi sel bakteri itu sendiri. Uji ini sangat penting dilakukan untuk mengetahui sifat dari suatu bakteri terhadap kebutuhan oksigen (Yulvizar, 2013).

Isolat T4.10 bersifat motil/dapat bergerak yang ditandai dengan adanya warna keruh tidak hanya pada tusukan, namun menyebar lebih luas dari area tusukan dan di tumbuh permukaan (Lampiran 6). Hal ini menandakan adanya alat gerak berupa *flagella* yang berfungsi untuk melakukan pergerakan. Menurut Dwijoseputro (2010), *flagella* merupakan salah satu struktur utama di luar sel bakteri yang menyebabkan terjadinya pergerakan (motilitas) pada sel bakteri. Golongan basil dapat bergerak dengan adanya *flagella* yang tersebar baik pada ujung-ujungnya maupun pada sisi (Anggraini, 2016).

Penelitian ini sesuai dengan Hatmanti harian (2000) yang mengatakan bahwa mayoritas jenis *Bacillus sp.* memproduksi katalase (bersifat katalase positif) dan bersifat

aerob/oksidatif. Uji oksidatif / fermentatif menunjukkan bahwa T4.10 bersifat oksidatif terhadap glukosa (Lampiran 4). Hal ini ditunjukkan dengan adanya perubahan warna hijau menjadi kuning pada media yang tidak ditutup paraffin, maka bakteri memanfaatkan karbohidrat pada kondisi aerob atau membutuhkan oksigen. Menurut Harry *et al.* (1962), bakteri memiliki kebutuhan yang berbeda akan oksigen. Beberapa bakteri tidak dapat tumbuh tanpa adanya oksigen, ada pula bakteri yang tetap tumbuh tanpa adanya oksigen. Hal ini menandakan bakteri tersebut tidak dapat melakukan fermentasi glukosa tanpa adanya oksigen (Anggraini, 2016).

4.3.2. Identifikasi Bakteri Secara Molekuler

Identifikasi bakteri dapat dilakukan dengan dua metode yaitu secara konvensional dan berbasis molekuler. Identifikasi konvensional dilakukan melalui metode pembiakan dan dilanjutkan dengan pemeriksaan karakteristik fisiologis dan biokimia. Metode ini membutuhkan waktu yang lebih lama. Sedangkan identifikasi berbasis molekuler lebih cepat dengan tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi, yaitu dengan analisis sekuensing gen 16S rRNA (16S *ribosomal Ribonucleic acid*). Dengan metode gen 16S rRNA dapat digunakan untuk identifikasi jika didapati sulit untuk mengidentifikasi bakteri secara fisiologi. Selain identifikasi secara fisiologis, uji biokimia juga bila dirasa tidak dapat dikenali maka metode ini dapat dijadikan sebagai alternatif (Sihombing, 2018).

Menurut Pangastuti (2006), gen 16S rRNA memiliki berbagai keunggulan yaitu bersifat unikitas atau identik pada setiap organisme, gen 16S rRNA dapat berubah sesuai jarak evolusinya sehingga dapat digunakan sebagai kronometer evolusi, gen 16S rRNA memiliki bagian yang bersifat konservatif untuk mengontruksi pohon filogenetik universal, memiliki bagian *hyper variable region* yang memudahkan untuk mengidentifikasi jenis bakteri.

Keuntungan dari Gen 16S rRNA, berdasarkan penelitian Dewa *et al.* 2015, yaitu dapat melihat kemiripan antar spesies bakteri. Kemiripan yang didapat juga dapat dikelompokkan dalam dua kelompok yaitu kemiripan yang cukup tinggi dan kemiripan

yang cukup jauh (rendah). Dengan metode Gen 16S rRNA, suatu genus dikatakan mirip apabila memiliki kemiripan 97% dan dikatakan satu spesies apabila kemiripan yang diperoleh 99% (Petti, 2007).

Pada penelitian ini, identifikasi secara molekuler dilakukan pada isolat bakteri kandidat bioremediasi yang dapat menurunkan TAN (*Total Ammonia Nitrogen*) terbesar, yaitu isolat T4.10. Identifikasi molekuler dilakukan dengan cara isolat murni dikirim ke laboratorium PT.INDOLAB UTAMA. Primer yang digunakan dalam proses PCR adalah primer forward 27F (5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3'), primer reverse 1492R (5' TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T 3'). Sedangkan, bahan primer yang digunakan dalam sequencing adalah primer forward 785F (5' GGA TTA GAT ACC CGT GTA 3'), primer reverse 907R (5' CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT 3'). Hasil analisa PCR DNA isolat yang diperoleh dengan kode T4.10 berupa sekuen nukleotida dalam format FASTA seperti yang terdapat dalam Gambar 3.

```
TGGAGTCGATGAGTGCTAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCA
GCTAACGCATTAAGCACTCCGCC TGGGGAGTACGGTCCGAAGACTGAAAC
TCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCAC AAGCGTGGAGCATGTGGTTTAAT
TCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGCTTGGACATCCTCTGACAACCTC
TAGAGATAGAGCGTTCCCTTCCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGG
TTGTCTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG
CAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACCTAAGGTGACT
GCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC
CTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGC
AAGACCGCGAGGTCAAGCC AATCCCATAAAACCATTTCTAGATTCGGATTG
TAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGTCAATCCCGGGATC
AGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCCTTGTACACACCCGCGCTCAC
ACCACGAGGTTTGTAAACACCCGAAGTCCGGTGAGTAAACCCTAAGGAC
AGCCGCC TAAGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCTAAAAGGGGGAAC
CCAAAAGGGGATTCCTGGTATTTAAGCAACATATACGATGCAAAATTTG
GGGAACGAACCCGATAACAATCTGGTCTACAAGGGGGGTACTCATGGG
TTAGTACTGGGGAAATGCCCTTTCCCTTTTATAAGCAAGTGACAAAACAGT
TACACACAAAACACCCGGATAAGGCACGGAGGAAAGGAACATAAGACGA
GAAAAAAAGCCGCCCCACCCAGGCCGTTGCGGCCGAAAAAACCCGGAA
GAACAAGACGCCCCCGAAAACAATAATGACC GCCGCAGGGGCCCGCC
CAAACGGCCCCCGGACAAAGCGGAATAGTGGGACCCCGCCCCCGCAAC
AGCCAAGATAAACAACCTCCGCGGGGATAGTTCCCTCCCCAAAAAAA
CCCTATTTTTTCTTACCCAAAAATTTATTTTCCCCCGCCCCCGGGA
GCGTGTCTCTCCACCTCTTTTATTTTTTTGTTTTGGGAATTTTT
TTCTTCTCCCCCTCTCTTCCACCCGGGGGGGGGGGGGGGGAATCA
CCGCGGGTTTTCCCGCCCGCCCCCGCCCCCGCTGCTCATGAATTTTT
CTTTTTTGGGGTGTGGGGTTTTGGGGGGTTTTTTTTTCTTTATAAAATG
CGAGGGGGGGGGCCCGCTCCCTTAATATATATATTATAAAAAAAAAAAAA
TTTTTTTTTTTTTTCTTTCTTTCTTCCCGGAGAAAGAAAGAAAAAAA
AGAAAAATAAAAATTAGTATTATTTTTTTTTTTGATTAGAATATACCCT
ACCACCGAGGGGAAGGTGGATGCCGCGGCCCGCTCTCCCTCCCGCC
CCCCCTCCCCCCCCCCCCACACAAAGAAAAATGTA
```

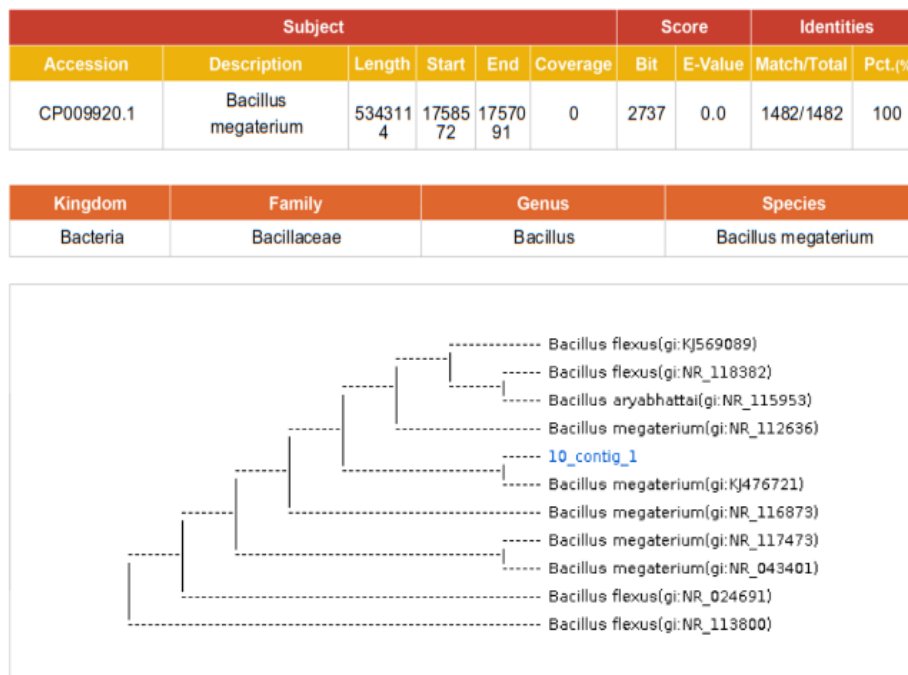
Gambar 2. Hasil Sekuensing DNA Isolasi Bakteri T4.10 dalam Format FASTA

Format FASTA merupakan format dengan basis teks untuk mewakili sekuen nukleotida atau sekuen protein, di mana pasangan basa atau asam amino yang diwakili menggunakan kode huruf tunggal. Kode huruf tunggal tersebut masing-masing mewakili basa pirimidin dan basa purin tertentu. Basa

pirimidin terdiri dari timin yang disimbolkan dengan huruf T dan sitosin yang disimbolkan dengan huruf C sedangkan basa purin terdiri dari adenin yang disimbolkan dengan huruf A dan guanin yang disimbolkan dengan huruf G (Untu Patricia *et al.*, 2015).

Sekuensing dilakukan perbandingan dengan database nukleotida menggunakan program *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) secara *online* melalui situs www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/. Data yang digunakan sebagai input adalah sekuen 16S rRNA dari isolat T4.10. Hasil keluaran dari program ini adalah tampilan sekuen yang memiliki kemiripan tinggi terhadap *database* (Sukmawati, 2015). Derajat kesamaan urutan basa gen pe-nyandi 16S rRNA lebih dari 97% bukan genus baru (Pangastuti, 2006).

Hasil analisis BLAST menunjukkan nama bakteri dan tingkat kesamaan urutan nukleotida dari rRNA isolat dengan urutan nukleotida dari spesies bakteri yang sesuai dalam database *GeneBank*. Berdasarkan hasil analisis BLAST yang di-peroleh dari sekuen RNA, diketahui bahwa isolat T4.10 memperoleh hasil berupa nilai *score* 2737 dan *match total* 1482/1482 (pct. 100 %) merupakan bakteri *Bacillus megaterium* (Gambar 3). Sampel bakteri dengan kode 10 dengan sekuen mikroba yang memiliki kemiripan tertinggi yaitu *Bacillus megaterium* (gi: KJ476721) yang dikoleksi dari akar dan daun tanaman *Nicotiana attenuate* daerah D1 Utah Barat Daya, Amerika Serikat.



Gambar 3. Hasil Analisis BLAST 16S rRNA dan pohon filogenetik

keterangan : sampel isolat bakteri kode 10 memiliki jarak genetik yang paling mirip dengan *Bacillus megaterium* (gi: KJ476721).

Bacillus megaterium termasuk dalam bakteri Gram positif, berbentuk batang dan membentuk endospora. Bakteri ini memiliki ciri-ciri berupa spora oval/slindris, fakultatif anaerob, mampu menghidrolisis gula dan kasein serta mempunyai dinding spora yang tipis. Bakteri *B. megaterium* ditemukan dalam tanah dan dianggap saprofit serta digolongkan bakteri mesofilik, yaitu memiliki temperatur optimum untuk pertumbuhan berkisar antara 25- 37 °C (Lestari *et al.*, 2018).

Karakteristik morfologi bakteri ini yaitu memiliki ekor dengan panjang $201\pm 3,9$ nm serta lebar yaitu $9,7\pm 0,6$ nm. Bakteri ini lebih stabil jika hidup pada pH yang berkisar antara 7-8. Bakteri *B. megaterium* termasuk dalam golongan bakteri mesofilik yaitu bakteri yang dapat bertahan hidup pada pH berkisar antara 5,5-8 (Heryan, 2012). Bakteri *B. megaterium* merupakan bakteri endofit dan merupakan agen hayati yang sangat potensial. De Vos *et al.* (2009) menyatakan bahwa beberapa strain *B. megaterium* mampu memfiksasi nitrogen. Metabolisme *B. megaterium* didalam lingkungan tanah menjadi aktif ketika substrat yang cocok untuk pertumbuhan tersedia (Kenneth, 2012).

Klasifikasi taksonomi *Bacillus megaterium* menurut Madigan (2012) adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Firmicutes
Kelas	: Bacilli
Ordo	: Bacillales
Famili	: Bacillaceae
Genus	: <i>Bacillus</i>
Spesies	: <i>Bacillus megaterium</i>

Hasil penelitian menunjukkan bahwa *B. megaterium* merupakan isolat terbaik yang mampu menurunkan TAN, oleh sebab itu, bakteri ini sangat potensial untuk dijadikan sebagai kandidat bakteri bioremediasi pendegradasi limbah tambak udang. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Lestari *et al.* (2018) yang menyatakan bahwa *B. megaterium* dapat digunakan sebagai organisme industri yang mampu menghasilkan berbagai protein dan sumber bioremediasi. Bakteri *B. megaterium* juga dianggap sebagai bakteri non-patogenik.

4.4. Pembahasan

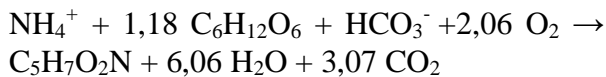
Bioremediasi merupakan penggunaan organisme untuk mendegradasi pencemar lingkungan (kontaminan) yang merugikan ke tingkat yang lebih aman melalui aktivitas metabolismenya. Pencemar lingkungan yang mempunyai efek buruk bagi ekosistem akuatik salah satunya adalah senyawa nitrogen amonia (*total ammonia nitrogen*) (Supono, 2019). Pada penelitian ini ditemukan isolat bakteri yang mampu menurunkan kandungan *total ammonia nitrogen* (TAN) sebesar 84,6 %. Bioaktivitas bakteri tersebut lebih baik jika dibandingkan dengan penelitian sebelumnya oleh Susanti (2014) yang hanya menurunkan kandungan TAN sebesar 60 %. Hal ini diduga karena bakteri yang berhasil di isolasi jenisnya berbeda. Masing masing bakteri memiliki karakteristik yang berbeda termasuk aktivitasnya dalam mendegradasi limbah budidaya.

Pada penelitian ini isolat bakteri terbaik dalam menurunkan TAN diidentifikasi sebagai bakteri *B. megaterium*. Efektivitas *B. megaterium* pada penelitian ini lebih baik dibanding Luo *et al.* (2016) yang mengisolasi bakteri *B. megaterium* dari kolam teknologi bioflok ikan mas. Bakteri tersebut hanya mampu menurunkan TAN sebesar 64 %, namun pada penelitian Aftabuddin Sheikh *et al.* (2013) *B. megaterium* yang diisolasi dari sedimen mangrove memiliki bioaktivitas yang lebih tinggi dibandingkan penelitian ini yaitu sebesar 94,5 %. Hal ini diduga karena ekosistem mangrove laut merupakan sumber yang bagus untuk isolasi mikroba yang berpotensi menghasilkan metabolit bioaktif penting (Mangamuri *et al.*, 2012). Lingkungan ekosistem mangrove sangat kaya akan materi organik karena berbagai aktivitas enzimatik dan metabolisme mikroba (Kizhekkedathu & Parukuttyamma, 2005).

Bacillus megaterium merupakan salah satu bakteri yang biasa ditemukan di tanah, termasuk bakteri endofit dan merupakan agen hayati yang sangat potensial. Bakteri *B. megaterium* adalah salah satu bakteri heterotrof (Adharani *et al.*, 2016), yang membutuhkan karbon organik dan nitrogen anorganik sebagai sumber energi. Bakteri

heterotrof juga mampu memanfaatkan amonium dan nitrat sebagai sumber nitrogen. Selain menguraikan bahan organik bakteri heterotrof juga mampu memperbaiki kualitas air dan menurunkan kadar amonia dalam perairan (Ernawati, 2014). Bakteri heterotrof akan mengasimilasi amonia-nitrogen langsung menjadi protein bakteri (Supono, 2019).

Penanganan amonia dalam kolam budidaya dengan bakteri heterotrof merupakan metode yang paling cepat dan efektif. Menurut Ebeling *et al.* 2006 proses pengubahan nitrogen dalam sistem akuakultur salah satunya adalah proses heterotrofik bakterial yang mengubah amonia langsung menjadi koloni bakteri. Reaksi tersebut dapat digambarkan dengan persamaan stoichiometri di bawah ini :



Dimana $\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$ merupakan formulasi biomasa bakteri sedangkan $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ merupakan sumber karbon dari karbohidrat sederhana (gula) (Supono, 2019). Dalam sistem akuakultur bakteri heterotrofik memainkan peran penting melalui mineralisasi dan dekomposisi limbah serta menyediakan pakan tambahan bagi larva udang. Penambahan *Bacillus megaterium* dalam air limbah budidaya secara efektif dapat meningkatkan kualitas air budidaya, mendorong pembentukan bioflok, dan kemudian membentuk model budidaya yang efisien dan sehat berbasis teknologi bioflok (Aftabuddin *et al.*, 2013).

Cara penguraian limbah budidaya oleh bakteri heterotrof adalah proses oksidasi yaitu proses memecah senyawa kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana. Bakteri heterotrof berperan penting untuk menjaga keseimbangan kualitas air karena bakteri heterotrof mampu mencerna bahan secara langsung dari lingkungan abiotik, ekskresi udang, atau dari organisme yang mati di dalam ekosistem perairan (Putra *et al.*, 2015). Nitrogen anorganik tingkat tinggi seperti nitrogen amonia dan nitrogen nitrit berbahaya bagi ikan dan dianggap berbahaya sebagai faktor pembatas produksi dalam budidaya

intensif, dibuktikan bahwa menambahkan *B. megaterium* ke air limbah budidaya bisa efektif mengurangi TAN (Liang luo *et al.*, 2016).

Menurut Andriani *et al.* (2017), bakteri *B. megaterium* sangat berpotensi sebagai probiotik. Probiotik adalah mikroorganisme yang memberikan keuntungan bagi inangnya (Irianto and Austin, 2002). Probiotik dapat digunakan sebagai food additive yang diberikan langsung ke wadah budidaya atau dicampur dengan pakan (Martínez Cruz *et al.*, 2012). Prinsip mekanisme kerja probiotik pada akuakultur adalah kompetisi dengan bakteri patogen, pengaktifan respon imun atau menstimulasi imunitas, kompetisi untuk mendapatkan nutrien, mengeluarkan substansi antibakteri, dekomposisi zat organik yang tidak diharapkan (Soeharsono *et al.*, 2010). Bakter probiotik dapat berpotensi membunuh bakteri patogen serta menghambat proses denitrifikasi yaitu terbentuknya nitrat dan nitrit yang dapat mencemari lingkungan perairan (Heryani, 2012).

Kemampuan bakteri *B. megaterium* tersebut dapat dimanfaatkan pembudidaya tambak udang untuk mendegradasi limbah yang dihasilkan selama proses produksi. Limbah nitrogen yang bersifat toksik akan di degradasi menjadi senyawa yang lebih sederhana dan dapat dimanfaatkan kembali oleh udang sebagai sumber metabolisme, sehingga terjadi akuakultur berkelanjutan (*Sustainable aquaculture*).

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa jumlah isolat bakteri yang terpilih adalah 12 isolat. Semua isolat bakteri tersebut dapat menurunkan *total ammonia nitrogen* (TAN). Isolat terbaik mampu menurunkan TAN sebesar 0,404 mg/L. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa isolat tersebut merupakan bakteri *Bacillus megaterium*.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pendegradasian amonia, nitrat dan

nitrit secara *in vivo*/ uji skala laboratorium dan lapang menggunakan bakteri tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Adharani N., Soewardi K., Syakti A. D., Hariyadi Sigid. 2016. Manajemen Kualitas Air dengan Teknologi Bioflok: Studi Kasus Pemeliharaan Ikan Lele (*Clarias Sp.*). *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia (JIPI)*, 21 (1) : 35-40
- Aftabuddin Sheikh, Kashem M. Abul, Sikder M. N. Azim, and Hakim M. Abdul. 2013. Use of *Streptomyces fradiae* and *Bacillus megaterium* as probiotics in the experimental culture of tiger shrimp *Penaeus monodon* (Crustacea, Penaeidae). *AAAL Bioflux*, 6(3) : 253–267.
- Andriani Yuli, Rochima. E, Safitri. R, and Rahayuningsih. S.R. 2017. Characterization of *Bacillus megaterium* and *Bacillus mycoides* Bacteria as Probiotic Bacteria in Fish and Shrimp Feed. *Knowledge E*, 1(1) : 127-135
- Anggraini Rika, Aliza Dwinna, Mellisa Siska. 2016. Identifikasi Bakteri *Aeromonas Hydrophila* dengan Uji Mikrobiologi pada Ikan Lele Dumbo (*Clarias Gariepinus*) yang Dibudidayakan di Kecamatan Baitussalam Kabupaten Aceh Besar. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Kelautan Dan Perikanan Unsyiah*, 1(2) : 270-286
- Anita Noer Heryani . 2012. Studi Viabilitas dan Pola Pertumbuhan *Bacillus megaterium* pada Konsentrasi Molase dan Waktu Inkubasi yang Berbeda. *Skripsi*. Surabaya : Universitas Airlangga.
- (APHA) American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation, & Water Environment Federation. 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater. *American Public Health Association*, 2 (1) : 1,207.
- Ariani Hatmanti. 2000. Pengenalan *Bacillus Spp.*. *Oseana*, 25 (1) : 31-41
- Artha, Sudarno, H. Pramono and LA Sari. 2019. Identification of extracellular enzyme-producing bacteria (proteolytic, cellulolytic, and amylolytic) in the sediment of extensive ponds in Tanggulangrejo, Gresik. *IOP Publishing Ltd. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 236 (1) : 012003.
- Badjoeri, M., & Widiyanto, T. 2008. Penggunaan Bakteri Nitrifikasi untuk bioremediasi dan pengaruhnya terhadap konsentrasi amonia dan nitrit di tambak udang. *Oseanologi dan Limnologi di Indonesia*, 34 (2) : 261-278.
- Barraza-Guardado, R. H., Arreola-Lizarraga, J. A., Lopez-Torres, M. A., Casillas-Hernandez, R., Miranda-Baeza, A., Magallon-Barrajas, F., & Ibarra-Gamez, C. 2013. Effluents of Shrimp Farms and Its Influence on the Coastal Ecosystems of Bahia de Kino, Mexico. *The Scientific World Journal*, 20 : 1-8.
- Bernard, K. 2012. The Genus *Corynebacterium* and Other Medically Relevant Coryneform-Like Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(10), 3152-3158.
- Cappucino. J.G.. and Sherman, N. 1983. *Microbiology: A Laboratory Manual*. New York : Addison Wesley Publishing company.
- Chen, J., Banks, D., Jarret, R.L.. Chang, C.J., and Smith, B.J. 2000. Use of 16S rDNA sequences as signature characters to identify *Xylella fastidiosa*. *Journal of Curro Microbiol*, 40 : 29-33.
- Clasceri, L., Greenberg, A., & Trussells, R. 1989. *Standard methods for the examination of water and waste water* (17th ed.). Baltimore: Port City Press.
- Cowan, S., & Steel, K. 1974. *Manual for the Identification of Medical Bacteria*. London: Cambridge University Press.
- Dewa Gede Agung Widyadnyana, I Dewa Made Sukrama, dan I Wayan Suardana. 2015. Identifikasi Bakteri Asam Laktat Isolat 9A dari Kolon Sapi Bali sebagai Probiotik melalui Analisis Gen 16S rRNA. *JS*, 33 (2) : 228-233.
- Devita Fitriani. 2016. Isolasi, Seleksi, dan Identifikasi Bakteri Kitinolitik pada

- Cairan Tanaman Kantong Semar (*Nepenthes* Spp.) sebagai Agen Biokontrol. *Skripsi*. Bogor : Institut Pertanian Bogor
- Dwidjoseputro. 2010. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Penerbit Djembatan: Jakarta
- Ebeling, J.M., M.B. Timmons, and J.J Bisogni. 2006. Engineering Analysis of Thestoichometry of Photoautotrophic, Autothrophic, and Heterothropic Removal of Ammonia-Nitrogen in Aquaculture Systems. *Aquaculture*, 257: 346 - 358
- Ernawati dwi. 2014. Pengaruh Pemberian Bakteri Heterotrof Terhadap Kualitas Air pada Budidaya Ikan Lele Dumbo (*Clarias sp.*) Tanpa Pergantian Air. *Skripsi*. Surabaya : Universitas Airlangga
- Fajri, M. N. 2017. Kajian Efektivitas Bakteri *Bacillus coagulans* dan *Bacillus polymyxa* terhadap Pertumbuhan dan Sintasan Udang Putih (*Litopenaeus vannamei*) yang Dipelihara pada Salinitas Rendah. *Skripsi*. Bandar Lampung: Universitas Lampung.
- Fry, J. 2000. Bacterial diversity and unculturable. *Journal of Microbiology Today*, 27 : 186 -188.
- Gintung Patantis dan Yusro Nuri Fawzya. 2009. Teknik Identifikasi Mikroorganisme Secara Molekuler. *Jurnal Squalen*, 4 (2) : 72-82
- Hadioetomo, R, S. (1990) *Mikrobiologi dasar dalam praktek teknik dan prosedur dasar laboratorium*. Penerbit PT Gramedia, Jakarta.
- Hastuti, Y. 2011. Nitrifikasi dan Denitrifikasi di tambak. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 10 (1) : 89 - 98.
- Hatmanti, A., 2000, Pengenalan *Bacillus spp.*, *Jurnal oseanografi lipi*, 25 (1) : 31-41.
- Irianto, A. and Austin, B. 2002. Probiotics in aquaculture. *Journal of Fish Diseases*, 25(11) : 633-642
- Jati, O. E. 2012. Analisis Hubungan Parameter Fisika Kimia Air dengan Total Bakteri pada Tambak Udang di BBPBAP Jepara. *Skripsi*. Semarang: Universitas Diponegoro.
- Kizhekkedathu N. N., Parukuttyamma P., 2005 Mangrove Actinomycetes as the source of lignolytic enzymes. *Actinomycetologica*, 19(1) : 40-47.
- Komarawidjaja, W. 2006. Pengaruh Perbedaan Dosis Oksigen Terlarut (DO) pada Degradasi Amonium Kolam Budidaya Udang. *Jurnal Hidrosfir TPSA*, 1(1) : 32-37.
- Lestari, D. A., Muchlissin, S. I., Mukaromah, A. H., Darmawati, S., & Ethica, S. N. (2018). Isolasi bakteri penghasil enzim protease *Bacillus megaterium* irod3 dari oncom merah pasca fermentasi 72 jam. In *Prosiding Seminar Nasional & Internasional*, 1 (1) : 31-39.
- Luo Liang, Zhao Z., Huang X., Du Xue, Wang Chang'an, Li Jinnan, Liansheng Wang, and Xu Qiyu. 2016. Isolation, Identification, and Optimization of Culture Conditions of a Biofloculant-Producing Bacterium *Bacillus megaterium* SP1 and Its Application in Aquaculture Wastewater Treatment. *BioMed Research International*, 16 (1) : 1-9.
- Madigan, J., David, A. S., & David, P. C. 2012. *Biology of Microorganism 13th Edition*. Benjamin Cummings, USA.
- Madigan, M. T., Martinko, J_M, Parker, J. 2000. *Brock Biology of Microorganisms*. Prentice-Hall International (UK) Limited, London.
- Mangamuri U. K., Vijayalakshmi M., Sudhakar P., Sreenivasulu K., 2012 Isolation, identification and molecular characterization of rare Actinomycetes from mangrove ecosystem of Nizampatnam. *Malaysian Journal of Microbiology*, 8 (2) : 83-91.
- Martinez Cruz, P., Ibanez, A. L., Monroy Hermosillo, O. A., & Ramírez Saad, H. C. 2012. Use of Probiotics in Aquaculture. *ISRN Microbiology*, 10 (1) : 1-12.
- Masnilah, R., A.L. Abadi., T.H. Astono., dan L.Q. Aini. 2013. Karakterisasi Bakteri Penyebab Penyakit Hawar Daun Edamame di Jember. *Berkala Ilmiah Pertanian*, 1(1): 10–14.
- Maudy R. N., Zulaika E., dan Shovitri M. 2019. Karakter Isolat Bakteri P1 dari Rhizosfer Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum*). *Jurnal Sains dan Seni*

- Institut Sepuluh Nopember*, 8 (2) : 66-67.
- Noviantina, J. 2014. Uji Patogenesitas Bakteri *Campylobacter* sp. TI6, *Listeria* sp. TI1, dan *Nitrosococcus* sp. TII5 pada Pemeliharaan Udang Vanname (*Litopenaeus vannamei*) serta Kemampuannya dalam Mendegradasi TAN (*Total Ammonia Nitrogen*). *Skripsi*. Bandar Lampung : Universitas Lampung.
- Nur, A. 2011. *Manajemen Pemeliharaan Udang Vaname*. Jakarta : Pusat Penyelidikan Kelautan dan Perikanan.
- Pamudi. 2018. Efektivitas Pengolahan Limbah Perikanan Budidaya dengan Pemanfaatan Probiotik untuk Pengelolaan Kawasan Tambak Berkelanjutan. *Skripsi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Pangastuti, A., 2006, Definisi Spesies Prokaryota Berdasarkan Urutan Basa Gen Penyandi 16s rRNA dan Gen Penyandi Protein, *Biodiversitas*, 3 (7) : 292-296.
- Pantjara, B., Nawang, A., Usman, & Rachmansyah. 2012. Pemanfaatan Bioflok pada Budidaya Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) Intensif. *Jurnal Ris Akuakultur*, 7 (1) : 61-72.
- Pelczar, M.J. dan Chan E.C.S. 2005. *Dasar-dasar mikrobiologi Jilid 1*. Terj. Dari *Elements of microbiology* oleh Hadioetomo, R.S., T. Imas, S.S. Tjitrosomo, S.L. Angka. UI Press, 8 : 443.
- Petti, P. A. 2007. Detection and identification of microorganisms by gene Amplification and Sequencing. *Clin. Infect Disc*, 44(8) :1108-1114.
- Priadie, B. 2012. Teknik Bioremediasi sebagai Alternatif dalam Upaya Pengendalian Pencemaran Air. *Jurnal Ilmu Lingkungan*, 10 (1) : 38-48.
- Putra S. J. W., Nitisupardjo, M., & Widyorini, N. 2014. Analisis Hubungan Bahan Organik dengan Total Bakteri pada Tambak Udang Intensif Sistem Semi Bioflok di BBPBAP Jepara. *Journal of Maquares*, 3 (3), 121-129.
- Ranjan, R., Siddhnath, & Bavitha, M. 2014. Bioremediation - A potential tool for management of aquatic pollution. *International Journal of Multidisciplinary Research and Development*, 1 (7) : 335-340.
- Rhodes, A.N., J.W. Urbance, H. Youga, H. Corlew- Newman, CA Reddy, M.J. Klug, J.M., and nedje, D.C. Fisher. 1998. Identification of bacterial isolates obtained from intestinal contents associated with 12,000-year old mastodon remain. *Journal Appl. Environ. Microbiol*, 64 (1) : 651-658.
- Safitri, R., Priadie, B., & Permatasari, I. P. 2015. The Performance of Bacterial Consortium in Various Carriers on The Bioremediation of River Water Polluted by Domestic Sewage. *Environmental Engineering*, 4 (1) : 120-126.
- Seema, C., & Jayasankar, R. 2015. Removal of nitrogen load in the experimental culture system of seaweed and shrimp. *Journal of Marine Biological Association of India*, 47 (2) : 150-153.
- Sihombing M.C.H, Simbala H.E.I., Yudistira A. 2018. Isolasi, Identifikasi Secara Molekuler Menggunakan Gen 16s rRNA dan Uji Aktivitas Antibakteri dari Bakteri Simbion Endofit Alga *Padina* sp. *Pharmakon*, 7 (2) : 41-52
- Smith, P. B., Tomfohrde, K. M., Rhoden, D. L., and A. Balows. 1972. API system: a multitube micromethod for identification of Enterobacteriaceae. *Journal Appl. Microbiol*, 24 : 449-452.
- Soeharsono. 2010. Probiotik Basis Ilmiah, Aplikasi, dan Aspek Praktis. Widya Padjajaran. Bandung.
- Subagiyo, S. M. 2012. Isolasi dan karakterisasi bakteri asam laktat dari usus udang penghasil bakteriosin sebagai agen antibakteria pada produk-produk hasil perikanan. *Jurnal Saintek Perikanan*, 8 (1) : 1-6.
- Sudarsono A. 2008. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri pada Ikan Laut dalam Spesies Ikan Gindara (*Lepidocibium flavobronneum*). *Skripsi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Suhartanti Mahreta, Sarjono Purbowatiningrum Ria, Aminin A.L.N.. 2010. Studi Filogeni dan Uji Potensi Enzim Ekstraseluler (amilase, β -

- galaktosidase, protease, katalase) Isolat *Alicyclobacillus* sp. Gedong Songo. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*, 13(3) : 80-87
- Sukmawati, N. M. S. 2015. *Bioinformatika*. Denpasar: Fakultas Peternakan Universitas Udayana.
- Supono. 2011. Studi perbandingan keragaan udang windu (*Penaeus monodon*) dan udang putih (*Litopenaeus vannamei*) pada tambak semi plastik. *Pena Akuatika*, 3(1) : 1-8.
- Supono. 2017. *Teknologi Produksi Udang*. Yogyakarta: Plantaxia.
- Supono. 2019. *Teknologi Biofloc ; Prinsip dan Aplikasi dalam Akuakultur*. Yogyakarta : Graha Ilmu.
- Suryani, Y. 2011. Bioremediasi Limbah Merkuri dengan Menggunakan Mikroba pada Lingkungan yang Tercemar. *Jurnal Istek*, 5 (1) : 139-148.
- Susanti, E., Harpeni, E., Setiawan, A., & Putri, B. 2014. Penapisan Bakteri Pendegradasi Total Ammonia Nitrogen dari Sedimen Tambak Tradisional Udang Windu (*Penaeus monodon*). *AQUASAINS*, 2 (2) : 145-148.
- Suslow, T.V., M.N. Scorth., and M. Isaka. 1982. Application of Rapid Methods for Gram Differentiation of Plant Pathogenic and Saprophytic Bacteria Without Staining. *Phytopathology*, 72 (7) : 917-918.
- Suwarsih, Marsoedi, Harahab, N., & Mahmudi, M. 2016. Kondisi Kualitas Air pada Budidaya Udang di Tambak Wilayah Pesisir Kec. Palang, Kab. Tuban. *Prosiding Seminar Nasional Kelautan 2016* (pp. 138-143). Madura: Universitas Trunojoyo.
- Suwoyo, H. S. 2009. Tingkat Konsumsi Oksigen Sedimen pada Dasar Tambak Intensif Udang Vaname (*Litopenaeus Vannamei*). *Tesis*. Bogor: Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Syah, R., Fahrur, M., Suwoyo, H. S., & Makmur. 2017. Performansi Instalasi Pengolah Air Limbah Tambak Superintensif. *Jurnal Media Akuakultur*, 12 (2) : 95-103.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. 2010. *Microbiology an introduction* (10th ed.). San Francisco: Pearson Benjamins Cummings.
- Untu Patricia, Rumengan Inneke F. M., Ginting Elvy L. 2015. Identifikasi Mikroba yang Koeksis dengan *Ascidia Lissoclinum patella* Menggunakan Sekuens Gen 16s rRNA. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*, 2 (1) : 23-33
- Wijaya, U. 2016. Pengkombinasian Bakteri *Bacillus polymyxa*, *Corynebacterium kutscheri* dan *Bacillus coagulan* dalam Mendegradasi TAN (Total Ammonia Nitrogen). *Skripsi*. Bandar Lampung: Universitas Lampung.
- Yulvizar Cut. 2013. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Probiotik pada *Rastrelliger* sp. *Biospecies*, 6 (2) : 1-7.