

**IDENTIFIKASI BAKTERI BIOREMEDIASI PENDEGRADASI  
TOTAL AMMONIA NITROGEN (TAN)  
IDENTIFICATION OF DEGRADATED BIOREMEDIATING BACTERIES  
TOTAL AMMONIA NITROGEN (TAN)**

Ramaita Ajizah Yuka\*, Agus Setyawan, Supono

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

\*Corresponding author email: [ramaitayuka1@gmail.com](mailto:ramaitayuka1@gmail.com)

Submitted: 11 September 2020 / Revised: 16 April 2021 / Accepted: 21 April 2021

<http://doi.org/10.21107/jk.v14i1.8499>

**ABSTRACT**

*Increasing the amount of feeding in shrimp culture feeding will trigger the accumulation of organic matter and toxic compounds in the form of waste in the pond. One of the effort that can be done is bioremediation or the return system of environmental conditions that are polluted through the addition of certain bacteria. This research aims to identify bioremediation degradation bacteria in shrimp pond waste. This study was held in November 2019 - March 2020. Twelve isolates of bacteria wick isolated from the shrimp pond sediment at Pasir Sakti, East Lampung and cultured on sewage media. Subsequent samples were screened to select total ammonia nitrogen (TAN) degradation bacteria candidates. Bacterial isolates with the best activity are subsequently identified morphologically including cell form, Gram test, motility, and molecular identification with 16S rRNA sequential analysis. The results showed that the best isolate were able to reducing TAN was T4.10 isolate with activity able to reduce TAN by 0,404 mg/L. Morphological, biochemical, and molecular identification confirm that the isolate was 100% Bacillus megaterium bacteria. 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.*

**Keywords:** Bacillus megaterium, Bioremediation, Screening, Shrimp Pond, Total Ammonia Nitrogen.

**ABSTRAK**

*Peningkatan jumlah pemberian pakan budidaya udang akan memicu terjadinya akumulasi bahan organik dan senyawa toksik berupa limbah dalam tambak. Salah satu upaya yang dapat dilakukan adalah bioremediasi atau sistem pengembalian kondisi lingkungan yang tercemar melalui penambahan bakteri tertentu. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi bakteri bioremediasi pendegradasi limbah tambak udang. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2019 – Maret 2020. Dua belas isolat bakteri diisolasi dari sedimen tambak udang vaname Pasir Sakti, Lampung Timur pada media Sewage. Sampel selanjutnya dilakukan penapisan (skrining) untuk memilih kandidat bakteri pendegradasi Total Ammonia Nitrogen (TAN). Isolat bakteri dengan aktivitas terbaik selanjutnya diidentifikasi secara morfologi meliputi bentuk sel, uji Gram, motilitas, dan identifikasi secara molekuler dengan analisis sekuen 16S rRNA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat terbaik yang mampu menurunkan TAN yaitu isolat T4.10 dengan aktivitas mampu menurunkan TAN sebesar 0,404 mg/L. Identifikasi morfologi, biokimia, dan molekuler mengkonfirmasi bahwa isolat tersebut 100 % merupakan bakteri Bacillus megaterium. Bakteri tersebut dapat dijadikan sebagai kandidat bioremediasi. Limbah tambak udang akan di degradasi menjadi senyawa yang dapat dimanfaatkan kembali untuk proses metabolisme udang sehingga terjadi akuakultur berkelanjutan (Sustainable aquaculture).*

**Kata kunci:** Bacillus megaterium, Bioremediasi, Tambak udang, Total Ammonia Nitrogen.

## 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 ( $\text{NH}_3$ ) dan nitrit ( $\text{NO}_2$ ) (Supono, 2019).

Menurut Kilawati dan Yunita (2014), kadar  $\text{NH}_3$  dan  $\text{NO}_2$  yang optimal untuk pertumbuhan udang vaname yaitu di bawah 0,01 ppm, sedangkan batas toleransi  $\text{NH}_3$  berkisar 0,01-0,2 ppm dan  $\text{NO}_2$  berkisar antara 0,01-0,1 ppm. Jika kadar  $\text{NH}_3$  dan  $\text{NO}_2$  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 dimanfaatkan sebagai bakteri bioremediasi.

Berdasarkan Susanti *et al.* (2014), ditemukan tiga isolat bakteri dalam tambak *Penaeus*

*monodon* yang mampu mengurangi kandungan Total Ammonia Nitrogen (TAN) 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 yang berasal dari isolat lokal. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi, menapisikan serta mengidentifikasi bakteri bioremediasi pendegradasi limbah tambak udang. Berdasarkan uraian diatas, maka dilakukan identifikasi bakteri bioremediasi dari tambak udang di Lampung Timur.

## MATERI DAN 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%,  $\text{H}_2\text{O}_2$  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 menggunakan botol *falcon* pada bagian dasar tambak. Sampel diambil dari satu lokasi tambak yaitu tambak nomor tiga.

Sampel diambil sebanyak 5 titik di dalam tambak tersebut. Masing-masing sampel sedimen diambil secara homogen sebanyak 25  $\mu\text{l}$  lalu diteteskan di atas media agar

sewage (media simulasi TAN). 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 diuji di Laboratorium Budidaya Perikanan, Fakultas Pertanian Universitas Lampung.

### Isolasi Bakteri

Sampel dalam media sewage (Tabel 3) diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang ( $28^{\circ}\text{C}$ - $30^{\circ}\text{C}$ ). Koloni yang terpisah dengan penampilan yang berbeda digoreskan ke media *nutrient agar* (NA) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu  $28^{\circ}\text{C}$ - $30^{\circ}\text{C}$ . 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

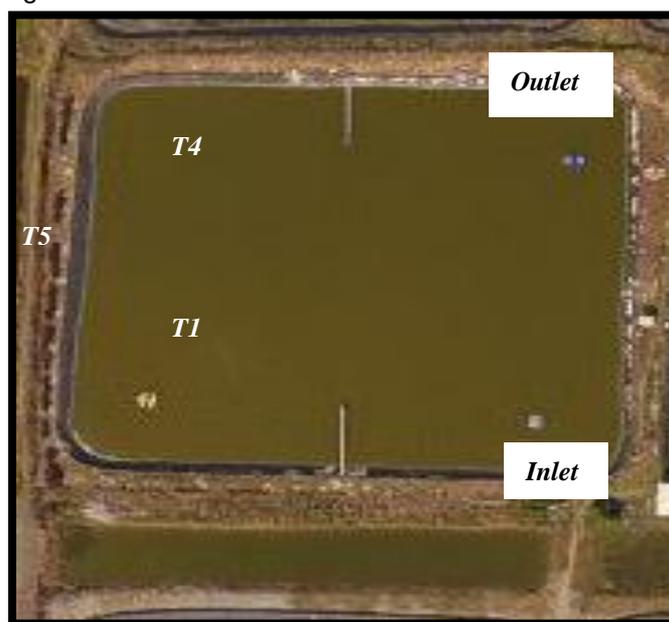
Bahan	Jumlah (g/L)
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	13,5
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,7
$\text{MgCl}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0,1
$\text{NaHCO}_3$	0,5
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,014
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,18
$\text{NH}_4\text{Cl}$	0,1
EDTA	0,2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

(Rodina, 1972 ; Susanti 2014)

### 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 ( $28^{\circ}\text{C}$ - $30^{\circ}\text{C}$ ). Analisis kadar TAN dilakukan dengan terlebih dahulu

menyaring sampel dengan kertas saring steril Whatman Cellulose Nitrate (WCN) nomor 7140104 dengan *mess size*  $0,45 \mu\text{m}$ , 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).



**Gambar 1.** Lokasi pengambilan sampel sedimen

## Identifikasi Bakteri 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).

### 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 dicampurkan. 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).

### 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).

### 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).

### 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% dicampurkan dengan isolat bakteri. Hasil positif ditandai dengan adanya gelembung gas, sedangkan hasil negatif tidak ada gelembung gas (Hadioetomo, 1990).

### 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/](http://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/](http://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

Tambak ini merupakan jenis tambak intensif (padat tebar tinggi) dengan kepadatan 118 ekor/m<sup>2</sup>. Produktivitas tambak mampu

meghasilkan 1,6-2 Ton per siklus dengan SR 75-85 %. Isolasi bakteri dipilih dari sedimen tambak yang mampu tumbuh di media *sewage*

(simulasi media TAN) adalah sebanyak 12 isolat dan isolat paling banyak tumbuh terdapat pada titik T4 (Tabel 4).

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

Pengenceran	T1	T2	T3	T4	T5	Jumlah bakteri
10 <sup>0</sup>	2	1	3	4	2	12

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

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 5). 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).

**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 pe-nurunan TAN mencapai 0,401 mg/L (83,9 %) dan 0,404 mg/L (84,6 %). Isolat terbaik pada penelitian ini selanjutnya dilakukan identifikasi, namun dari kedua isolat tersebut hanya satu yang dilanjutkan untuk diidentifikasi yaitu Isolat T4.10.

**Identifikasi Bakteri  
 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).

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. 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%.

**Tabel 4.** Identifikasi Morfologi dan Biokimia Isolat T4.10

No	Karakteristik	T4.10
1	Elevasi	Timbul
2	Gram	Positif
3	Motilitas	Motil
4	Katalase	Positif
5	Oksidatif/ Fermentatif	Oksidatif

Hasil uji katalase yang telah dilakukan menunjukkan hasil positif. Hal ini ditandai dengan adanya gelembung-gelembung gas pada isolat T4.10 yang ditetesi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Isolat T4.10 bersifat motil/dapat bergerak, hal ini menandakan adanya alat gerak berupa *flagella* yang berfungsi untuk melakukan pergerakan. Menurut Dwijoseputro (2010).

### Identifikasi Bakteri Secara Molekuler

Pada penelitian ini, identifikasi secara molekuler dilakukan pada isolat bakteri kandidat bioremediasi yang dapat menurunkan TAN (*Total Ammonia Nitrogen*)

terbesar, yaitu isolat T4.10. 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.

```
TGGAGTCGATGAGTGTAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTAGTGTGCA
GCTAACGCATTAAGCACTCCGCCGTTGGGGAGTACGGTCCGAAGACTGAAAC
TCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGTTTAAT
TCGAAGCAACGC GAAGAACCCTTACCAGGTC TTGACATCTCTGACAACTC
TAGAGTAGAGCGTTCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGG
TTGTCGTCAAGTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG
CAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACCTAAGGTGACT
GCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC
CTTATGACCTGGGC TACACAGCTGTACAATGGATGGTACAAGGGGCTGC
AAGACCGCGAGGTCAAGCCAATCCATAAAAACATTCTCAGTTCGGATTG
TAGGCTGCAACTCGCC TACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATC
AGCATGCCCGGGTGAATACGTTCCCGGGCC TTGTACACACCGCCGTCAC
ACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGGAGTAACC GTAAGGAGCT
AGCCGCC TAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCTAAAAGGGGGAAC
CCAAAAGGGGATTCTCTGGTATTTAAC GAACATATACGATGCAAAATTG
GGGAACGAACCCGATAACAATCCTGGTCTACAAGGGGGTACTCATGGG
TTAGTACTGGGGAAATGCCCTTTCCCTTTTATAAGCAAGTGACAAAACAGT
TACACACAAAAAACACCCGGATAAGGCACGGAGGAAAGGAACATAAGACGA
GAAAAAAAGCCGCCACCCAGGCCGTTGCGGCCGAAAAAACCCGGAA
GAACAAGACGCCCCCGAAACAAATAATGACCCGCCAGGGGCCGCC
CAAACGGCCCCCGACAAGGC GGAATAGTGGGACCCCGCCCGGCAAC
AGCCAAGATCAAACAACCTCCGCGGGGATTAGTTCCTTCCCAAAAAAAA
CCCTATTTTTCTCTACCAAAAAATTTATTTTTCCCCCCCCCCCCACCGGA
GGTGTCTCTCCACCTCTTTATTTTTTTGTTTTGGGAATATTTTT
TTCCTTCCCCCTCTCTTCCACCCGGGGGGGGGGGGGGGGGAATCA
CCGCGGGTTTCCCCGCCCCCCCCCCCCCCCGCTGCTCATGAATTTTT
CTTTTTGGGGTGTGGGGTTTTGGGGGGTTTTTTTTTCTTTATAAAATG
CGAGGGGGGGGCCGCCCTCTCCTAATATATATATTATAAAAAA
TTTTTTTTTTTTTCTTTCTTTCTTCCCGC GAGAAAGAAAGAAAAA
AGAAAAATAAAATAGTATTATTTTTTTTTTTGATTAGAAC TATACCT
ACCACCGAGGGAAGGTGGATGCCGCCGCCGCCCTCTTCCCTCCCC
CCCCCTCCCCCCCCCCCCACACAAAGAAAAATGTAA
```

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

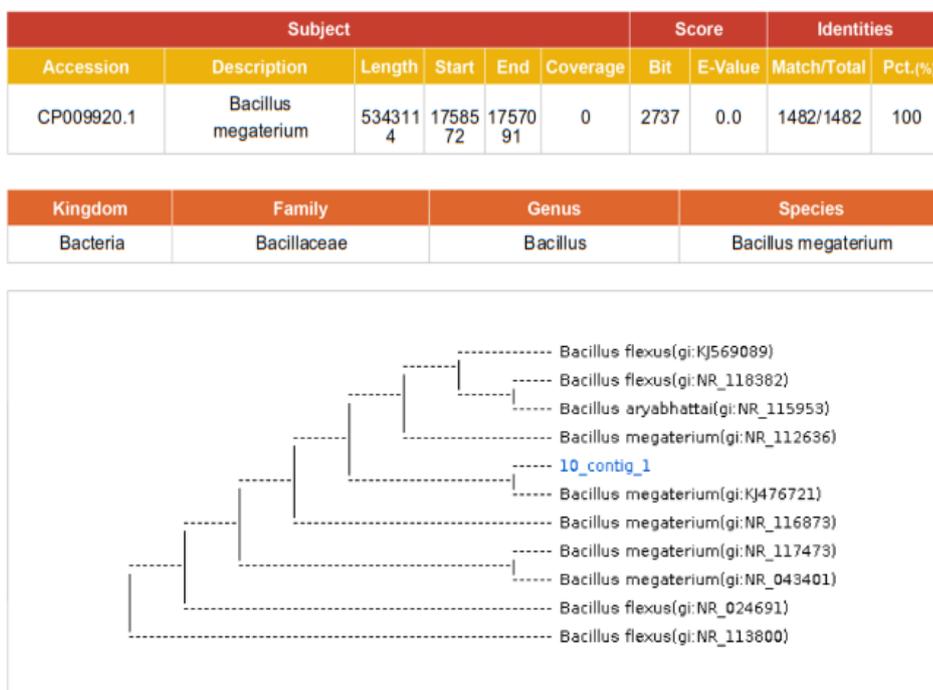
Format FASTA merupakan format dengan basis teks untuk mewakili sekuen nukleotida atau sekuen protein, di mana pasangan basa atau asam amino yang diwakili menggunakan kode huruf tunggal. Kode huruf tunggal tersebut masing-masing mewakili basa pirimidin dan basa purin tertentu. Basa pirimidin terdiri dari 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/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). 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 sekuens 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 sekuens mikroba yang memiliki kemiripan tertinggi yaitu *Bacillus megaterium* (gi: KJ476721).



**Gambar 3.** Hasil Analisis BLAST 16S rRNA dan pohon filogenetik sampel isolat bakteri kode 10 yang memiliki jarak genetik terdekat dengan *Bacillus megaterium* (gi: KJ476721).

*Bacillus megaterium* termasuk dalam bakteri Gram positif, berbentuk batang dan membentuk endospora. Karakteristik morfologi bakteri ini yaitu memiliki ekor dengan panjang  $201 \pm 3,9$  nm serta lebar yaitu  $9,7 \pm 0,6$  nm. Bakteri *B. megaterium* merupakan bakteri endofit dan merupakan agen hayati yang sangat potensial.

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

- Kingdom : Bacteria
- Filum : Firmicutes
- Kelas : Bacilli
- Ordo : Bacillales
- Famili : Bacillaceae
- Genus : *Bacillus*
- Spesies: *Bacillus megaterium*

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.

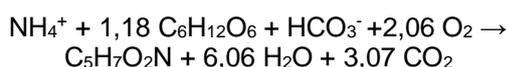
### Pembahasan

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 Liang 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.

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 & 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 nutrisi, mengeluarkan substansi antibakteri, dekomposisi zat organik yang tidak diharapkan (Soeharsono *et al.*, 2010). Bakteri 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*).

## KESIMPULAN DAN SARAN

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*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adharani, N., Soewardi, K., Syakti, A. D., & Hariyadi, S. (2016). Manajemen kualitas air dengan teknologi bioflok: Studi kasus pemeliharaan ikan lele (*Clarias Sp.*). *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 21(1), 35-40.
- Aftabuddin, S., Kashem, M. A., Kader, M. A., Sikder, M. N. A., & Hakim, M. A. (2013). Use of *Streptomyces fradiae* and *Bacillus megaterium* as probiotics in the experimental culture of tiger shrimp *Penaeus monodon* (Crustacea, Penaeidae). *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation*, 6(3), 253-267.
- Andriani, Y., Rochima, E., Safitri, R., & Rahayuningsih, S. R. (2017). Characterization of *Bacillus megaterium* and *Bacillus mycoides* bacteria as probiotic bacteria in fish and shrimp feed. *KnE Life Sciences*, 127-135.
- American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation, & Water Environment Federation. (1912). *Standard methods for the examination of water and wastewater* (Vol. 2). American Public Health Association.
- Badjoeri, M., & Widiyanto, T. (2008). Penggunaan bakteri nitrifikasi untuk bioremediasi dan pengaruhnya terhadap konsentrasi amonia dan nitrit di tambak udang. *Jurnal Oseanologi dan Limnologi di Indonesia*, 34(2), 261-278.
- Clasceri, L., Greenberg, A., & Trussells, R. 1989. *Standard methods for the examination of water and waste water* (17th ed.). Baltimore: Port City Press.
- Dwidjoseputro. 2010. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Penerbit Djembatan: Jakarta
- Ebeling, J. M., Timmons, M. B., & Bisogni, J. J. (2006). Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*, 257(1-4), 346-358.
- ERNAWATI, D. (2014). *Pengaruh Pemberian Bakteri Heterotrof Terhadap Kualitas Air pada Budidaya Ikan Lele Dumbo (Clarias Sp.) Tanpa Pergantian Air* (Doctoral dissertation, UNIVERSITAS AIRLANGGA).
- Hadioetomo, R. S. (1990). *Mikrobiologi dasar dalam praktek: teknik dan prosedur dasar laboratorium*. PT Gramedia.
- Heryani, A. N. (2012). *Studi Viabilitas dan Pola Pertumbuhan Bacillus Megaterium Pada Konsentrasi Molase Dan Waktu Inkubasi yang Berbeda* (Doctoral dissertation, UNIVERSITAS AIRLANGGA).
- Irianto, A., & Austin, B. (2002). Probiotics in aquaculture. *Journal of fish diseases*, 25(11), 633-642.
- Niladevi, K. N., & Prema, P. (2005). Mangrove actinomycetes as the source of ligninolytic enzymes. *Actinomycetologica*, 19(2), 40-47.
- 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* (Vol. 1, No. 1).
- Luo, L., Zhao, Z., Huang, X., Du, X., Wang, C. A., Li, J., ... & Xu, Q. (2016). Isolation, identification, and optimization of culture conditions of a bioflocculant-producing bacterium *Bacillus megaterium* SP1 and its application in aquaculture wastewater treatment. *BioMed research international*, 2016..
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A., & Clark, D. P. (2012). A brief journey to the microbial world. *Brock biology of microorganisms*, 13th edition. Benjamin Cummings, New York, 25-30.
- Mangamuri, U. K., Muvva, V., Poda, S., & Kamma, S. (2012). Isolation, identification and molecular characterization of rare actinomycetes from mangrove ecosystem of Nizampatnam. *Malaysian Journal of Microbiology*, 8(2), 83-91.
- Martínez Cruz, P., Ibáñez, A. L., Monroy Herмосillo, O. A., & Ramírez Saad, H. C. (2012). Use of probiotics in aquaculture. *International Scholarly Research Notices*, 2012.

- Masnilah, R., Astono, T. H., & Aini, L. Q. (2013). Karakterisasi bakteri penyebab penyakit hawar daun edamame di Jember. *Berkala Ilmiah Pertanian*, 1(1), 10-14.
- Nur, A. (2011). Manajemen pemeliharaan udang vaname. *General Directorate of Fisheries Culture, BBPBAP Jepara. Center of Fisheries and Marines. Jakarta.*
- Pangastuti, A. (2006). Definisi spesies prokaryota berdasarkan urutan basa gen penyandi 16S rRNA dan gen penyandi protein. *Biodiversitas*, 7(3), 292-296.
- Pelczar, M. J., & Chan, E. C. S. (2005). Dasar-dasar Mikrobiologi. Edisi 1. *Terjemahan dari Elements of Microbiology, oleh Ratna siri Hadioetomo, UI-Press, Jakarta.*
- Soeharsono, L. A., Safitri, R., Sjojjan, O., Abdullah, S., Rostika, R., Lengkey, H. A., & Mushawwir, A. (2010). Probiotik Basis Ilmiah, Aplikasi, dan Aspek Praktis. *Penerbit Widya Padjadjaran. Bandung.*
- Sudarsono, A. (2008). Isolasi dan karakterisasi bakteri pada ikan laut dalam spesies ikan gindara (*Lepidocibium flavobronneum*). *Program Studi Teknologi Hasil Perikanan. Bogor: IPB. Hal, 1-12.*
- Sukmawati, N. M. S. 2015. *Bioinformatika*. Denpasar: Fakultas Peternakan Universitas Udayana.
- Supono. 2019. *Teknologi Biofloc ; Prinsip dan Aplikasi dalam Akuakultur*. Yogyakarta : Graha Ilmu.
- Susanti, E., Harpeni, E., Setyawan, A., & Putri, B. (2014). Penapisan Bakteri Pendegradasi Total Ammonia Nitrogen dari Sedimen Tambak Tradisional Udang Windu (*Penaeus monodon*). *AQUASAINS: Jurnal Ilmu Perikanan dan Sumberdaya Perairan*, 2(2), 145-148.
- Suslow, T. V., Schroth, M. N., & Isaka, M. (1982). Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology (USA)*.
- Untu, P., Rumengan, I. F., & Ginting, E. L. (2015). Identifikasi Mikroba yang Koeksis Dengan *Ascidia Lissoclinum patella* Menggunakan Sekuens Gen 16S rRNA. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*, 3(2), 23-33.