

**ANALISIS BAKTERI PEREDUKSI KONSENTRASI LOGAM TIMBAL $Pb(CH_3COO)_2$
MENGUNAKAN GEN 16S Rrna
ANALYSIS OF BACTERIA IN THE REDUCTION OF THE CONCENTRATION OF LEAD METAL
 $Pb(CH_3COO)_2$ USING GEN 16S Rrna**

Yudi Nurul Ihsan^{1*}, Kalysta Fellatami², Rega Permana³, Yeni Mulyani¹, Tri Dewi K Pribadi⁴

¹Departemen Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Padjadjaran

²Fisheries College, Ocean University of China

³Departemen Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Padjadjaran

⁴Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran

*Corresponding author e-mail: yudi.ihsan@unpad.ac.id/+6282127615924

Submitted: 17 May 2020 / Revised: 08 August 2020 / Accepted: 11 August 2020

<http://doi.org/10.21107/jk.v13i2.7285>

ABSTRACT

*This study aims to obtain the type and capabilities of bacteria in the reduction of the concentration of lead metal $Pb(CH_3COO)_2$ from sediments of the Karangsong Coast, Indramayu. Methods used namely exploratory methods and the resulting data is analyzed in the descriptive. In molecular identification methods using 16S rRNA Gene which is a universal primer for bacterium. Bacterial sequences obtained from GenBank data analyzed by NCBI (National Center of Biotechnology Information) sites. The results of this research show that eleven isolates of bacteria that the pore water of sediment derived from the highest reduction of lead metal $Pb(CH_3COO)_2$ concentration of 1.5 mgL^{-1} be 0.364 mgL^{-1} with a value of efficiency reached 75.7%. Four isolates bacterial with the highest density values were identical to the *Albirehodobacter marinus* strain N9 (ACC. No. NR 126203.1) with identity value 98% and kinship value 100%, *Pseudoalteromonas tetraodonis* strain NBRC 103034 (ACC. No. NR 114187.1) with identity value 81% and kinship value 84%, *Pseudoalteromonas lipolytica* strains LMEB 39 (ACC. No. NR 116629.1) with identity value 98% and kinship value 96%. *Pseudoalteromonas lipolytica* strains LMEB 39 (ACC. No. NR 116629.1) with identity value 93% and kinship value 93%.*

Keywords: Bacteria, Bioremediation, 16S rRNA gene, Lead Metal

ABSTRAK

*Riset ini bertujuan untuk mendapatkan jenis dan kemampuan bakteri dalam mereduksi konsentrasi logam timbal $Pb(CH_3COO)_2$ dari sedimen Pantai Karangsong, Indramayu. Metode yang digunakan yaitu metode eksploratif dan data yang dihasilkan dianalisis secara deskriptif. Metode identifikasi secara molekular menggunakan Gen 16S rRNA yang merupakan primer universal untuk bakteri. Sekuens bakteri yang didapatkan dianalisis dengan data GenBank dari situs NCBI (National Center of Biotechnology Information). Hasil riset ini menunjukkan bahwa sebelas isolat bakteri yang berasal dari air pori sedimen paling tinggi mereduksi logam timbal $Pb(CH_3COO)_2$ dari konsentrasi $1,5 \text{ mgL}^{-1}$ menjadi $0,364 \text{ mgL}^{-1}$ dengan nilai efisiensi mencapai 75,7%. Empat isolat bakteri dengan nilai kepadatan tertinggi identik dengan *Albirehodobacter marinus* strain N9 (Acc. No. NR 126203.1) dengan nilai identity 98% dan nilai kekerabatan 100%, *Pseudoalteromonas tetraodonis* strain NBRC 103034 (Acc. No. NR 114187.1) dengan nilai identity 81% dan nilai kekerabatan 84%, *Pseudoalteromonas lipolytica* strain LMEB 39 (Acc. No. NR 116629.1) dengan nilai identity 98% dan nilai kekerabatan 96%. *Pseudoalteromonas lipolytica* strain LMEB 39 (Acc. No. NR 116629.1) dengan nilai identity 93% dan nilai kekerabatan 87%.*

Kata Kunci: Bakteri, Bioremediasi, Gen 16S rRNA, Logam Timbal

PENDAHULUAN

Pencemaran di wilayah pesisir merupakan kasus yang sering terjadi, sumber pencemaran

dan kerusakan di wilayah pesisir ini berasal dari kegiatan yang ada di daratan dan lautan. Salah satu bahan pencemar yang mencemari wilayah pesisir yaitu logam timbal (Pb). Jenis logam

tersebut termasuk logam nonessensial sehingga keberadaannya tidak memberikan pengaruh baik. Badan perairan yang telah tercemar logam timbal (Pb), jika melebihi konsentrasi yang semestinya maka dapat mengakibatkan kematian bagi biota perairan tersebut (Wulandari *et al.*, 2009).

Untuk meminimalisir kadar logam timbal (Pb) yang tinggi dibutuhkan agen bioremediasi salah satunya yaitu bakteri. Bakteri tersebut dikenal sebagai bakteri *indigenus* atau bakteri asal ekosistem yang telah beradaptasi dengan lingkungan asalnya sehingga memungkinkan memiliki kemampuan reduksi dalam penanganan lingkungan yang tercemar logam timbal (Pb) (Ahmad 2018). Bakteri tersebut dapat diketahui kemampuannya dalam mereduksi konsentrasi logam timbal (Pb) dengan pengujian secara eksperimental. Selain itu dapat diketahui jenis dan kekerabatannya melalui identifikasi molekular menggunakan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) menggunakan Gen 16S rRNA. Riset ini bertujuan untuk mendapatkan jenis bakteri dan sejauh man kemampuan bakteri tersebut dalam mereduksi konsentrasi logam timbal (Pb) dari sedimen Pantai Karangsong, Indramayu, Jawa Barat.

MATERI DAN METODE

Pengambilan Sampel

Riset ini dilakukan pada bulan April sampai dengan November 2018. Pengambilan sampel dan data perairan dilakukan melalui pengukuran secara langsung (*in situ*). Sampel sedimen diambil dari dekat dermaga Pantai Karangsong pada 4 April 2018. Adapun koordinat pengambilan sampel sedimen yaitu pada 6°15'–6°40' LS dan 107°52'–108°36' BT. Pengambilan sampel *porewater* pada sedimen yang tercemar dilakukan dengan menggunakan *pistoncore* pada kedalaman 30-60 cm sebanyak 3 kali pengulangan. Sampel air pori yang diambil menggunakan suntikan berukuran 3 ml, kemudian dimasukkan pada botol steril dan disimpan dalam *cool box*. Setelah itu dilakukan pengambilan data parameter kualitas perairan meliputi suhu, salinitas, pH, dan DO (*Dissolved Oxygen*), serta dilakukan pengukuran kadar logam timbal (Pb) terlarut di Pantai Karangsong.

Uji Reduksi Logam Berat Timbal (Pb)

Bakteri pada air pori sedimen dimasukkan pada larutan Pb(CH₃COO)₂ dengan kadar 0,5 mgL⁻¹, 1,0 mgL⁻¹, dan 1,5 mgL⁻¹. Masing-masing konsentrasi tersebut dibuat menjadi lima

larutan dan diamati pada jam ke-0 (T₀), jam ke-6 (T₂), jam ke-12 (T₃), jam ke-24 (T₄) dan jam ke-48 (T₅). Penghentian metabolisme dilakukan dengan cara menyuntikkan larutan alkohol 95% pada setiap waktu pengamatan yang telah ditentukan. Kemudian dilakukan pengukuran konsentrasi logam timbal Pb(CH₃COO)₂ menggunakan SSA (Spektrofotometri Serapan Atom) Himedia, serta perhitungan kepadatan bakteri dengan metode TPC (*Total Plate Count*).

Kultur dan Pemurnian Bakteri Pereduksi Konsentrasi Logam Timbal Pb(CH₃COO)₂

Kultur dan pemurnian bakteri pereduksi logam timbal dilakukan untuk mendapatkan isolat bakteri murni yang akan dilakukan identifikasi secara molekular. Sumber yang digunakan berasal dari air pori yang terkandung pada larutan logam timbal Pb(CH₃COO)₂ pada pengamatan jam ke-48. Bakteri yang terkandung pada sumber tersebut merupakan bakteri yang mampu tumbuh pada konsentrasi logam timbal yang telah ditentukan. Kultur bakteri dilakukan dengan metode *pour plate*, dan sumber diencerkan hingga 10⁻⁵ dengan suhu 37°C selama 24 jam. Pemurnian dilakukan dengan metode cawan gores dengan menggunakan medium padat NA (Nutrien Agar).

Pewarnaan Gram Bakteri

Pewarnaan gram bakteri bertujuan untuk mengetahui sifat gram bakteri (gram positif atau gram negative) serta melihat bentuk morfologi sel bakteri. Zat yang digunakan adalah kristal violet sebagai zat pewarna gram gram negatif. Sifat gram bakteri positif ditunjukkan dengan warna biru, sedangkan sifat gram negatif ditunjukkan dengan warna ungu.

Uji Tantang Bakteri Terhadap Logam Timbal Pb(CH₃COO)₂

Uji tantang ini bertujuan untuk melihat ketahanan dan pertumbuhan bakteri terhadap larutan yang mengandung logam timbal Pb(CH₃COO)₂. Uji tantang ini dilakukan dengan menginokulasikan bakteri ke dalam medium cair *Nutrien Broth* (NB) yang telah mengandung logam timbal Pb(CH₃COO)₂ dengan konsentrasi 1,5 mgL⁻¹. Metode yang digunakan pada uji tantang ini merujuk pada riset yang telah dilakukan Lewaru dkk (2012). Isolat bakteri diinokulasi pada *incubator shaker* pada suhu 37°C selama 18 jam. Kemudian diukur menggunakan spektrofotometer TECAN pada jam ke-0 dan jam ke-18 dengan panjang gelombang 600 nm.

Ekstraksi DNA bakteri

Ekstraksi DNA bakteri bertujuan untuk memisahkan komponen DNA dengan komponen sel lainnya. Metode yang digunakan yaitu fenol-kloroform, dengan tahap homogenisasi (tahap lisis sel) menggunakan reagen dari TRIsure. Prosedur yang digunakan berdasarkan protokol ekstraksi DNA bakteri dari TRIsure BIOLINE. Tahapan ekstraksi DNA meliputi homogenisasi, fase pemisahan, presipitasi DNA, pencucian DNA, dan *Redessolving* DNA. Selanjutnya DNA diukur kemurnian dan konsentrasinya secara spektrofotometri dengan menggunakan spektrofotometri pada panjang gelombang (λ) 260 nm dan 280 nm.

Amplifikasi DNA (PCR)

DNA *template* yang sudah diisolasi kemudian diamplifikasi dengan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Amplifikasi ini bertujuan untuk memperbanyak jumlah DNA secara *in-vitro*. Metode yang digunakan dalam amplifikasi DNA ini mengacu pada riset yang telah dilakukan oleh Mihdir *et al.*, (2016). Proses PCR dimulai dengan amplifikasi menggunakan primer 9F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan 1542R (5'AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3').

Elektroforesis

Pada tahap ini menggunakan gel agarosa dengan konsentrasi yaitu 1% untuk elektroforesis DNA hasil amplifikasi. Staining gel yang digunakan adalah *Syber Safe* dari ThermoFisher dengan perbandingan 1:10.000. DNA *ladder* yang digunakan berukuran 1 kb (10.000 bp) sebanyak 2 μ l dengan target ukuran pita DNA yaitu ± 1500 bp. DNA *ladder* yang digunakan berukuran 1 kb (10.000 bp) sebanyak 2 μ l dengan target ukuran pita DNA yaitu ± 1500 bp. DNA sampel hasil amplifikasi dielektroforesis sebanyak 2,5 μ l dan dicampur dengan *loading dye* (pemberat) sebanyak 0,5 μ l. Proses elektroforesis dijalankan selama 30 menit dengan tegangan 100 volt dan arus 100 mA. Setelah itu gel agarosa dipindahkan pada UV transiluminator untuk diamati pita band yang terbentuk.

Sequencing & BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*)

Sekuensing DNA atau pengurutan basa DNA ini bertujuan untuk menentukan urutan basa nitrogen (adenin, guanin, sitosin dan timin) dalam suatu sampel. Metode yang digunakan adalah metode *Sanger* dilakukan oleh Perusahaan *First Base* di Singapore. Hasil

sequencing didapatkan sekuens yang akan diolah menggunakan *software* Bioedit. Selanjutnya hasil pengolahan data dilakukan BLAST pada situs NCBI (*National Center of Biotechnology Information*).

Analisis Filogenetik

Analisis filogenetik dari sekuens nukleotida bertujuan untuk mengetahui nenek moyang dan kekerabatan organisme (Ward, 1998). Untuk konstruksi pohon filogenetik menggunakan *software* MEGA X.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kondisi Umum Perairan

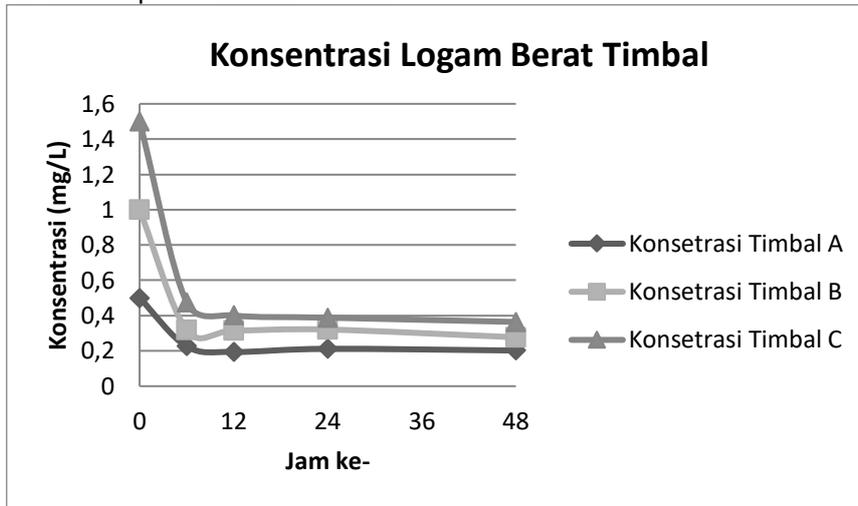
Kondisi pengambilan sampel memiliki tekstur sedimen jenis lumpur, berwarna abu-abu, berbau menyengat, dan memiliki bekas-bekas tumpahan minyak diatas perairan bekas pembuangan kapal-kapal yang berlabuh. Kondisi ini sama seperti sedimen yang berada di bagian barat Teluk Jakarta yang mengandung kadar logam berat tergolong tinggi dengan karakter sedimen yang berupa lumpur halus dengan permukaan hitam abu-abu dan berbau busuk (Rochyatun *et al.*, 2006).

Selain kondisi lokasi pengambilan sampel, adapun data parameter kualitas perairan di Pantai Karangsong yaitu nilai suhu sebesar 32°C Kondisi suhu di perairan ini masih tergolong wajar untuk perairan tropik. Variasi suhu perairan tropik tergolong wajar apabila nilainya berkisar antara 25,6-32,3°C (Patty, 2013). Pengukuran suhu pada riset ini dilakukan pada bulan April dimana pada bulan tersebut termasuk kedalam musim pancaroba awal tahun sehingga suhu yang didapat tinggi. Kemudian salinitas yang didapat dari riset lapangan rata-rata adalah 29,7 ppt. menandakan lokasi tersebut merupakan kawasan yang masih dipengaruhi oleh daratan seperti adanya percampuran air tawar dari aliran sungai (Patty, 2013). Nilai pH 6,8 dimana nilai tersebut dianggap sebagai batas aman pH perairan untuk kehidupan biota (Susana, 2009). dan nilai DO yaitu 5,62. Rendahnya kadar oksigen dikarnakan stasiun dekat muara sungai (estuari) yang erat kaitannya dengan kekeruhan air laut dan juga diduga disebabkan semakin bertambahnya aktivitas mikroorganisme untuk menguraikan zat organik menjadi zat anorganik yang menggunakan oksigen terlarut (bioproses) di perairan ini (Patty, 2013).

Uji Reduksi Logam Timbal Pb(CH₃COO)₂ dan Pertumbuhan Kepadatan Bakteri

menurunkan konsentrasi logam timbal Pb(CH₃COO)₂. Hasil uji reduksi tertera pada Gambar 1 di bawah ini.

Uji reduksi dilakukan untuk mengetahui seberapa besar kemampuan bakteri dalam

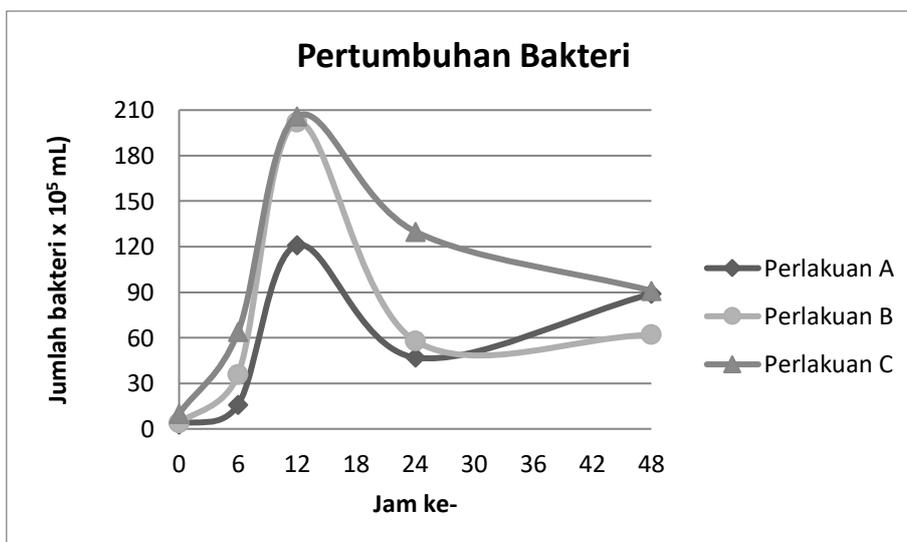


Gambar 1. Hasil uji reduksi logam timbal Pb(CH₃COO)₂

Berdasarkan Gambar 1, dapat diketahui bahwa bakteri yang terkandung pada air pori sedimen dapat mereduksi logam timbal Pb(CH₃COO)₂ pada jam ke-0 hingga jam ke-48. Mulai dari perlakuan A dengan konsentrasi 0,5 mgL⁻¹ menjadi 0,202 mgL⁻¹; perlakuan B dengan konsentrasi 1,0 mgL⁻¹ menjadi 0,277 mgL⁻¹; serta perlakuan C dari konsentrasi 1,5 mgL⁻¹ menjadi 0,364 mgL⁻¹ selama 48 jam. Penurunan konsentrasi tersebut menunjukkan bahwa bakteri yang terkandung pada air pori

sedimen mampu mereduksi konsentrasi logam timbal Pb(CH₃COO)₂.

Hal ini sesuai dengan riset yang telah dilakukan oleh Satya dan Larashati (2012), yang membuktikan bahwa bakteri yang resisten terhadap timbal juga dapat menurunkan kadar konsentrasi timbal dari 15 mgL⁻¹ menjadi 0 mgL⁻¹ dengan efisiensi penurunan kadarnya mencapai 100%.



Gambar 2. Grafik pertumbuhan koloni bakteri

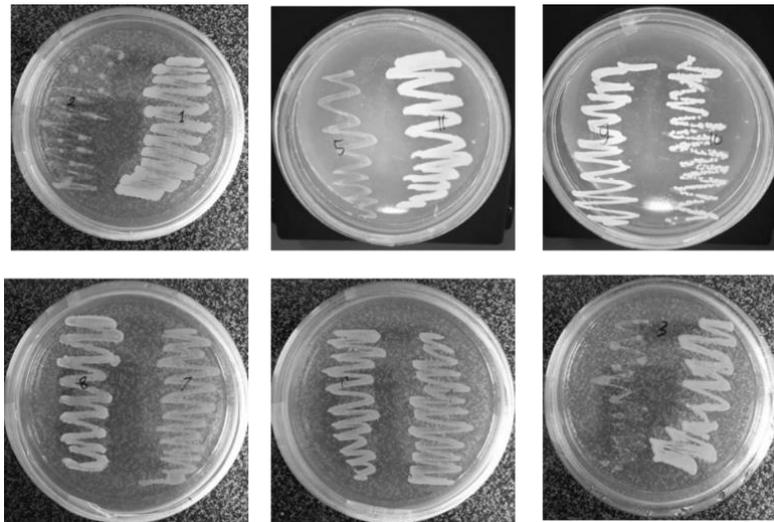
Berdasarkan Gambar 2, dapat diketahui bahwa terjadi pertumbuhan bakteri seiring bertambahnya waktu dan seiring bertambahnya konsentrasi logam timbal $Pb(CH_3COO)_2$. Konsentrasi $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ terjadi pertumbuhan bakteri dari $10 \text{ cfu} \times 10^{-5} \text{ ml}$ menjadi $91 \text{ cfu} \times 10^{-5} \text{ ml}$. Sedangkan konsentrasi $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ terjadi pertumbuhan bakteri dari $4 \text{ cfu} \times 10^{-5} \text{ ml}$ menjadi $62 \text{ cfu} \times 10^{-5} \text{ ml}$. Serta pada konsentrasi $1,5 \text{ mgL}^{-1}$ terjadi pertumbuhan bakteri dari $3 \text{ cfu} \times 10^{-5} \text{ ml}$ menjadi $89 \text{ cfu} \times 10^{-5} \text{ ml}$.

Merujuk pada Khoiroh (2014) salah satu bakteri pereduksi logam timbal $Pb(CH_3COO)_2$ yaitu *Pseudomonas pseudomallei* diketahui pertumbuhannya meningkat pada larutan

logam timbal $Pb(CH_3COO)_2$ di hari ke-20 jumlah bakteri $6 \text{ cfu} \times 10^{-8} \text{ ml}$ kemudian menurun di hari ke-30 jumlah bakteri menjadi $1,72 \text{ cfu} \times 10^{-8} \text{ ml}$, namun kembali naik di hari ke-40 menjadi $2,43 \text{ cfu} \times 10^{-8} \text{ ml}$ namun tidak terlihat jelas fase kematiannya.

Kultur dan Pemurnian Bakteri Pereduksi Logam Timbal $Pb(CH_3COO)_2$

Hasil kultur dari tiga perlakuan konsentrasi logam timbal $Pb(CH_3COO)_2$ $0,5 \text{ mgL}^{-1}$; $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ dan $1,5 \text{ mgL}^{-1}$, didapatkan sebelas isolat bakteri yang memiliki ciri morfologi yang berbeda. Bakteri tersebut belum diketahui sudah murni sebelum dilakukan pengamatan bentuk sel dari hasil pengujian gram.

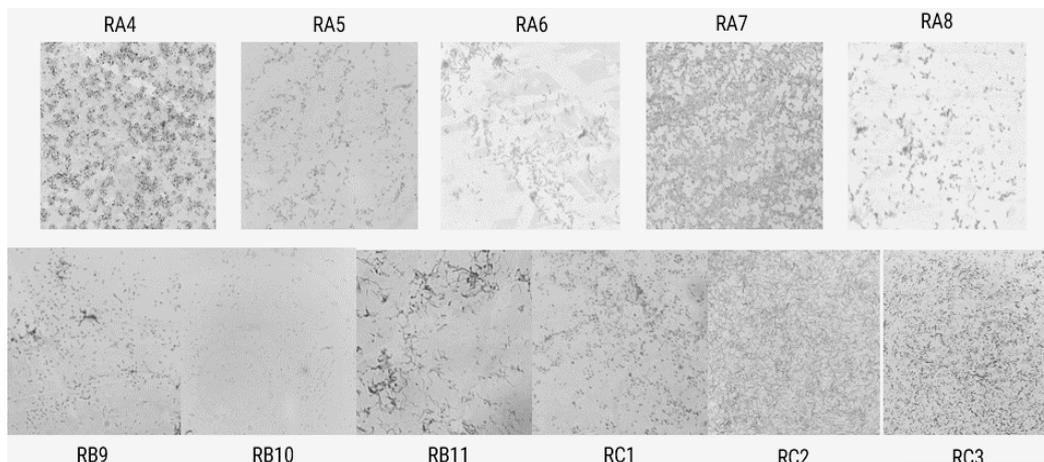


Gambar 3. Hasil kultur dan pemurnian bakteri

Pewarnaan Gram Bakteri

Sifat gram kedelapan isolat bakteri bersifat gram negatif. Selain itu, bentuk sel bakteri

beragam, yaitu berbentuk bulat dan filamen. Hasil pewarnaan gram bakteri tertera pada Gambar 4.



Gambar 4. Hasil pewarnaan gram bakteri

Uji Tantang Bakteri Terhadap Logam Timbal Pb(CH₃COO)₂

Bakteri yang dilakukan uji tantang merupakan bakteri terpilih yang benar-benar murni, yakni isolat bakteri Pb 1, Pb 2, Pb 3, Pb 4, Pb 5, Pb 6, Pb 10 dan Pb 11. Delapan isolat bakteri yang

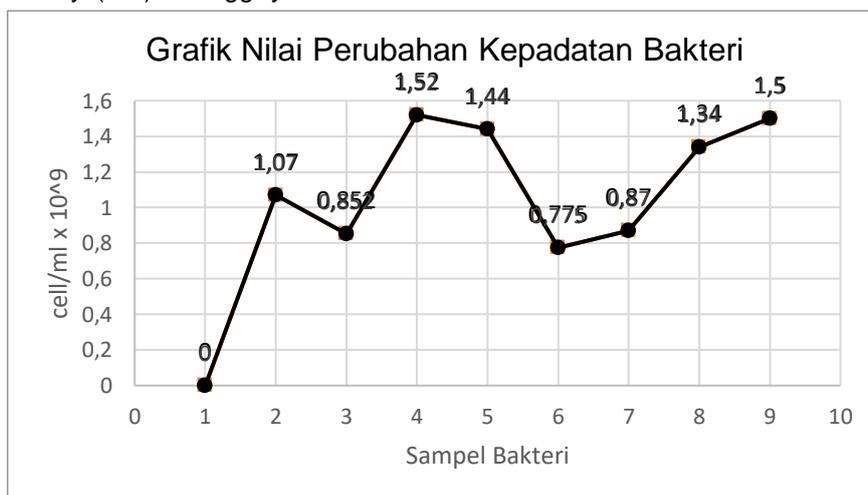
dianggap murni selanjutnya dilakukan uji tantang terhadap logam timbal Pb (CH₃COO)₂. Kemudian isolat bakteri diukur nilai OD (*Optical Density*) dan kepadatannya pada jam ke-0 dan jam ke-18. Hasil uji tantang tertera pada Tabel 1.

Tabel 1. Nilai *optical density* (OD) pada t=0 dan t=1

Sampel	Nilai (OD) awal	Nilai (OD) akhir	Nilai Perubahan (OD)
Kontrol	0.0000	0.0000	0.0000
Pb 1	0.0714	1.4088	1.3374
Pb 2	0.0821	1.1470	1.0649
Pb 3	0.0823	1.9767	1.8944
Pb 4	0.0716	1.8754	1.8038
Pb 5	0.0821	1.0508	0.9687
Pb 6	0.0861	1.1734	1.0873
Pb 10	0.0737	1.7441	1.7604
Pb 11	0.0863	1.9642	1.8779

Hasil pengujian ini diukur dengan menggunakan spektrofotometer untuk mengetahui nilai kekeruhan bakteri tersebut. Hasil nilai kekeruhan (*Optical Density*) yang didapatkan kemudian diubah menjadi cells/mL untuk mengetahui kepadatan sel bakteri. Berdasarkan hasil didapatkan 4 isolat dengan nilai *Optical Density* (OD) tertinggi yaitu Pb 3

sebesar 1,8944 ; Pb 4 sebesar 1,8038 ; Pb 10 sebesar 1,6704 dan Pb 11 sebesar 1,8779. Selain itu, keempat isolat bakteri ini memiliki nilai kepadatan sel bakteri tertinggi yaitu Pb 3 sebesar 1,52 x 10⁹ ; Pb 4 sebesar 1,44 x 10⁹ ; Pb 10 sebesar 1,34 x 10⁹ dan Pb 11 sebesar 1,5 x 10⁹.



Gambar 5. Grafik Nilai Kepadatan Bakteri

Pengukuran nilai *Optical Density* (OD) dan perhitungan kepadatan sel bakteri ini menunjukkan hasil yang saling berhubungan. Semakin tinggi nilai *Optical Density* (OD) maka jumlah bakteri juga semakin banyak. Menurut Lizayana *et al.*, (2016) semakin besar nilai *Optical Density* (OD) artinya semakin banyak cahaya yang diserap bakteri tersebut dan sangat sedikit cahaya yang terlewatkan. Sehingga dari data tersebut dapat dikatakan bahwa isolat bakteri tersebut mampu beradaptasi dan tahan terhadap logam timbal (Pb).

Hal ini diperkuat oleh Hughes dan Rolle (1989) yang menyatakan bahwa adanya bakteri yang mampu mengadsorbsi logam berat 2pada dinding selnya melalui proses adsorbsi, produksi senyawa ekstraseluler atau sistem enzimatik. Isolat bakteri yang telah diuji tantang selanjutnya dipilih 4 bakteri dengan tingkat kepadatan tertinggi untuk dilanjutkan ke tahap identifikasi dengan metode molekular menggunakan gen 16S rRNA. Isolat bakteri tersebut adalah isolat Pb 3, Pb 4, Pb 10 dan Pb 11.

Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA genom bakteri merupakan langkah pertama untuk mengidentifikasi bakteri. Menurut Madigan (1997) metode identifikasi molekuler merupakan metode yang akurat dalam mengidentifikasi bakteri. Ekstraksi DNA ini bertujuan untuk memisahkan DNA dengan komponen –

komponen lainnya seperti protein dan RNA. Proses ekstraksi DNA merupakan uji kuantitatif pada analisis molekuler karena dapat diketahui kemurnian dan konsentrasi dari DNA yang telah diekstraksi. Kemurnian DNA yang baik ditentukan oleh kontaminasi protein maupun RNA pada larutan. Hasil kemurnian dan konsentrasi DNA tertera pada Tabel 2.

Tabel 2. Kemurnian dan Konsentrasi DNA

Sampel	A260	A280	Konsentrasi ng/μL	Kemurnian (260/280)
Pb 3	0.1569	0.0921	156.9	1.70
Pb 4	0.2087	0.1086	208.7	1.92
Pb 10	0.2048	0.1192	204.8	1.72
Pb 11	0.1520	0.0850	152	1.79

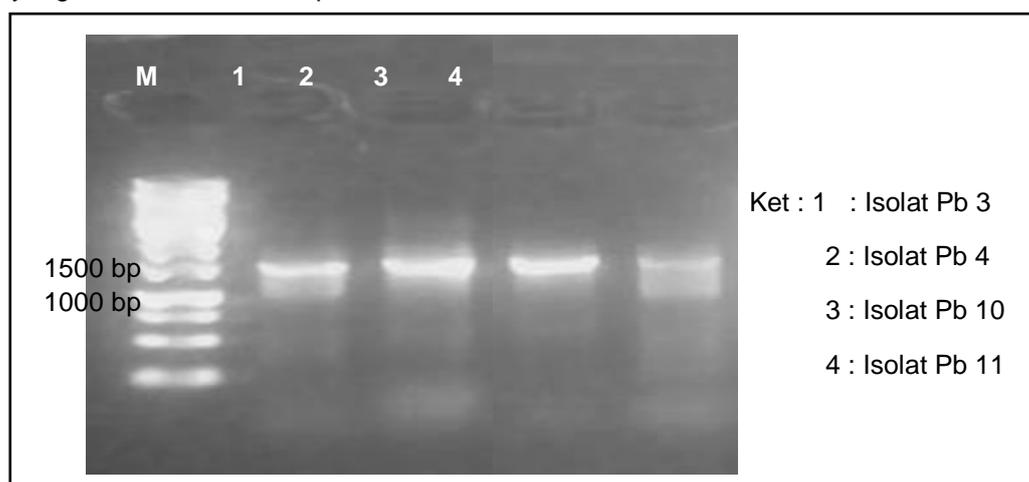
Nilai kemurnian dari 4 DNA sampel menunjukkan 3 DNA sampel tidak baik dan hanya 1 DNA sample yang sesuai dengan kualitas DNA yang ditetapkan sebesar 1.8 – 2.0. Menurut Fatchiyah *et al.*, (2011) nilai kemurnian DNA dapat diukur dengan menghitung nilai absorbansi 260 nm dibagi dengan nilai absorbansi 280 (A260/A280), dengan nilai kemurnian DNA berkisar 1.8 – 2.0. DNA sampel yang tidak baik artinya belum murni dan masih mengandung komponen protein. Hal ini sesuai dengan *Termos Fisher Scientific* (2008) jika DNA yang memiliki nilai dibawah 1.8 artinya terkontaminasi protein sedangkan nilai diatas 2.0 artinya terkontaminasi RNA. Adanya kontaminasi protein pada DNA sampel ini diduga karena kurang maksimalnya pada saar prepitasi DNA sampel.

Konsentrasi DNA sampel yang dihasilkan bervariasi antara 152 - 208,7 ng/μL. Hal ini diduga adanya bahan campuran dalam suatu produk mempengaruhi konsentrasi DNA yang didapatkan. Menurut (Wardani *et al.*, 2017) bahan yang ditambahkan dalam produk olahan

menyebabkan DNA yang diekstraksi tercampur dengan senyawa kontaminan lain seperti oligopeptida, polisakarida protein dan bahan organik lainnya.

Amplifikasi DNA

Amplifikasi merupakan tahap lanjut dalam mengidentifikasi bakteri. Tujuan amplifikasi menurut (Nursyirwani, 2007) yaitu penggandaan jumlah molekul DNA secara eksponensial dalam waktu yang relative singkat. Amplifikasi ini dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) sebanyak 29 siklus. Keberhasilan proses amplifikasi genom DNA bakteri bergantung pada urutan primer dan suhu *annealing* yang digunakan. Primer yang digunakan pada proses PCR ini yaitu 16S rRNA (9F & 1542R) dengan target ukuran pita DNA yaitu 1500 bp. Marker DNA yang digunakan yaitu DNA *ladder* 1 kb, serta dielektroforesis dengan konsentrasi agar 1%. Hasil elektroforesis DNA divisualisasikan dengan sinar UV dan menunjukkan hasil positif, yaitu terbentuknya pita DNA pada gel agarose dengan ukuran yang sesuai target.



Gambar 6. Hasil elektroforesis gel agarose 1%

DNA hasil Amplifikasi Berdasarkan Gambar 5, diketahui bahwa proses amplifikasi gen 16S rRNA menunjukkan hasil positif dan berjalan dengan baik karena dapat dilihat bahwa pita DNA yang terbentuk berada pada ukuran \pm 1500 bp. Menurut Nikunj Kumar dan Dhruvil (2012) gen 16S rRNA ini memiliki ukuran yang cukup panjang jika digunakan untuk keperluan bioinformatika (\pm 1500 bp) dan dapat mengaplifikasi daerah 16S rRNA dari seluruh bakteri. Selain itu, suhu *annealing* yang telah dioptimasi pada program PCR untuk proses amplifikasi DNA juga berjalan dengan baik.

Pada sampel DNA Pb 11 pita yang terbentuk tidak terlalu tebal dibandingkan dengan sampel DNA Pb 3, Pb 4 dan Pb 10. Hal tersebut terjadi karena hasil dari pengukuran konsentrasi pada sampel DNA Pb 11 konsentrasinya lebih rendah dibandingkan sampel DNA lainnya. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Weeden *et al.*, (1992) yang menyatakan bahwa smear tersebut bisa merupakan kontaminan bahan organik seperti protein dan RNA serta sisa dari

larutan-larutan yang masih terbawa selama proses ekstraksi. Selain itu, meskipun pita DNA terbentuk dengan baik tetapi masih terdapat *smear* yang terbentuk dibawah pita DNA. Terdapatnya *smear* ini disebabkan karena adanya kontaminan protein dan bahan lain saat proses ekstraksi (Azizah *et al.*, 2015).

Analisis Pensejajaran Urutan Nukleotida Hasil Sekuensing Dengan Database GenBank NCBI

Sebanyak 4 sampel hasil PCR gen 16S rRNA telah disekuensing oleh 1st BASE di Singapura berhasil diidentifikasi urutan basa nukleotida. Data yang diperoleh dari sekuensing ini berupa urutan basa nukleotida sekuen *forward* dan *reverse*. Data sekuens *forward* dan *reverse* diolah menggunakan piranti lunak BioEdit yang kemudian dilakukan identifikasi dengan program BLAST (*Basic Alignment Search Tools*) pada situs NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Data hasil sekuensing tertera pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Identifikasi Isolat Gen 16S dengan Program BLAST

Sampel	Query Cover	E-value	Identity	Spesies	Accession
PB 3	96%	0.0	98%	<i>Albirhodobacter marinus</i> strain N9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	NR 126203.1
PB 4	87%	0.0	81%	<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i> strain NBRC 103034 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	NR 114187.1
PB 10	95%	0.0	98%	<i>Pseudoalteromonas lipolytica</i> strain LMEB 39 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	NR 116629.1
PB 11	92%	0.0	93%	<i>Pseudoalteromonas lipolytica</i> strain LMEB 39 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	NR 116629.1

Hasil dari Blast menunjukkan spesies bakteri untuk isolat Pb 3 memiliki kemiripan dengan spesies bakteri *Albirhodobacter marinus strain N9* dengan nilai *Query Cover* 96% dan *Identity* sebesar 98%. Persentase tersebut menunjukkan bahwa dari seluruh sekuen gen 16S rRNA sampel Pb 3 yang berhasil dicocokkan sebanyak 96%. dan dari 96% *Query Cover* tersebut 98% memiliki kemiripan dengan spesies bakteri *Albirhodobacter marinus strain N9*. Untuk isolat Pb 4 memiliki kemiripan dengan spesies bakteri *Pseudoalteromonas tetraodonis strain NBRC 103034* dengan nilai *Query Cover* 87% dan *Identity* sebesar 81%. Untuk isolat Pb 10 memiliki kemiripan dengan bakteri spesies *Pseudoalteromonas lipolytica strain LMEB 39* dengan nilai *Query Cover* 95% dan *Identity* sebesar 98%. Sedangkan untuk isolat Pb 11 adalah *Pseudoalteromonas*

lipolytica strain LMEB 39 dengan nilai *Query Cover* 93% dan *Identity* sebesar 92%.

Selain itu, *E-value* dari masing– masing sampel bernilai 0.0 menunjukkan semakin signifikan penjejarian dengan hasil BLAST. Menurut Sabbathini *et al.*, (2017) nilai 0,0 mengartikan sekuens dari isolat tidak memiliki kemungkinan lain pada kesempatan penjejarian sekuens yang dilakukan. Maka apabila nilai *E-value* yang didapatkan semakin tinggi menunjukkan tingkat homologi antar sekuens semakin rendah, sedangkan nilai *E-value* yang semakin rendah menunjukkan tingkat homologi antar sekuens semakin tinggi.

Hasil BLAST dua dari empat isolat memiliki nilai identifikasi diatas angka 97% sehingga dapat diartikan data tersebut baik dan penyejajaran yang signifikan. Menurut Stackebrandt dan

Goebel (1995) spesies bakteri yang memiliki homologi atau *Identity* lebih dari atau sama dengan 97% dapat dikatakan sama. Isolat Pb 4 dan isolat Pb 11 memiliki *Identity* yang rendah yaitu 81% dan 92%. Menurut Drancourt et al., (2000) berdasarkan data urutan gen 16S rRNA, *identity* \leq 97% dapat dinyatakan bahwa isolat yang dibandingkan berada pada genus yang sama. Sedangkan *identity* antara 89-93% menunjukkan famili yang berbeda. Diduga isolat Pb 4 merupakan spesies baru dengan famili yang berbeda dan Pb 11 merupakan spesies baru dengan genus yang sama *Pseudoalteromonas lipolytica* strain LMEB 39.

Menurut Janda dan Abbott (2002) identifikasi taksonomi bakteri untuk lebih validasi dan akurasi ilmiah perlu dilakukan berdasarkan *polyphasic approach* yaitu pendekatan dengan menggunakan kombinasi dari metode pengujian fenotip (uji biokimia, analisis asam lemak dan analisis numerik) dan metode pengujian genotip.

***Albirhodobacter marinus* strain N9**

Nupur et al., (2013) pertama kali menemukan *Albirhodobacter marinus* di laut Vishakhapatnam, Andhra Pradesh, India. Spesies bakteri *Albirhodobacter marinus* strain N9 masuk kedalam genus *Albirhodobacter*, ordo *Rhodobacteraceae*, kelas *Alphaproteobacteria* dan filum *Proteobacteria*. Kelas dari *Alphaproteobacteria* ini mencakup kebanyakan proteobakter oligotrof yaitu bakteri yang mampu tumbuh pada kadar nutrient rendah. *Alphaproteobacteria* dapat memanfaatkan nutrisi dalam berbagai cara seperti fiksasi nitrogen, kemoheterotrof, atau kemoautotrof. Beberapa bakteri ini mampu menggunakan hidrogen, ammonia, metana, asam lemak volatile sebagai substratnya (Hidayat et al., 2018)

Bakteri *Albirhodobacter marinus* ini merupakan bakteri gram negatif, berbentuk basil (batang) dan anaerob fakultatif. Lebar sel sekitar 0,5 – 0,8 μ m dan panjang sekitar 2-3 μ m, koloni berbentuk lingkaran, berdiameter 2-4 mm dan berwarna putih kekuningan. Bakteri ini tumbuh pada suhu berkisar antara 30°C - 37°C dengan suhu optimum sebesar 30°C dan pH optimum sebesar 7,5. *Albirhodobacter marinus* mampu hidup pada salinitas 2 - 9%. Berdasarkan ciri – ciri tersebut bakteri *Albirhodobacter marinus* sesuai dengan isolat bakteri hasil pengamatan morfologi dan pewarnaan gram yang telah dilakukan.

***Pseudoalteromonas tetraodonis* strain NBRC 103034**

Bakteri *Pseudoalteromonas tetraodonis* ini pertama kali ditemukan oleh Simidu et al., (1990) pada lendir permukaan ikan buntal yang menghasilkan *tetrodotoxin*. Spesies bakteri *Pseudoalteromonas tetraodonis* strain NBRC 103034 masuk kedalam genus *Pseudoalteromonas*, ordo *Alteromonadales*, kelas *Gammaproteobacteria* dan filum *Proteobacteria*. Kelas *Gammaproteobacteria* ini kebanyakan kemolitotrof dimana bakteri ini memperoleh energi menggunakan senyawa anorganik. *Gammaproteobacteria* memiliki potensi untuk mengoksidasi karbon, sulfur, besi dan nitrogen (Lefèvre et al., 2011).

Pseudoalteromonas tetraodonis merupakan bakteri gram negatif, berbentuk basil (batang), berukuran 1,0 μ m – 2,4 μ m. Bakteri *Pseudoalteromonas tetraodonis* ini tumbuh pada suhu 4 – 35 °C (Simidu et al., 1990). Selain itu bakteri ini mampu menghasilkan *tetrodotoxin*, enzim gelatinase dan lipase. Menurut Deskawati (2014) *Tetrodotoxin* merupakan *neurotoxin* yang memiliki berat molekul rendah (319,27) bersifat racun tetapi dapat dimanfaatkan terutama pada bidang farmasi. Genus *Pseudoalteromonas* ini diusulkan oleh Gauthier et al., (1995) mewakili sekelompok bakteri laut yang dikelompokkan oleh hubungan filogenetik berdasarkan gen 16S rRNA. Genus *Pseudoalteromonas* ini merupakan bakteri gram negatif, bersifat aerobik, sel berbentuk batang dan memiliki metabolisme *chemoheterotrophic* (Bowman dan McMeekin, 2005).

***Pseudoalteromonas lipolytica* strain LMEB 39**

Menurut Wu et al., (2010) *Pseudoalteromonas lipolytica* pertama kali ditemukan di muara sungai Yangtze dekat laut Cina Timur. Spesies bakteri *Pseudoalteromonas lipolytica* strain LMEB 39 masuk kedalam genus *Pseudoalteromonas*, ordo *Alteromonadales*, kelas *Gammaproteobacteria* dan filum *Proteobacteria*.

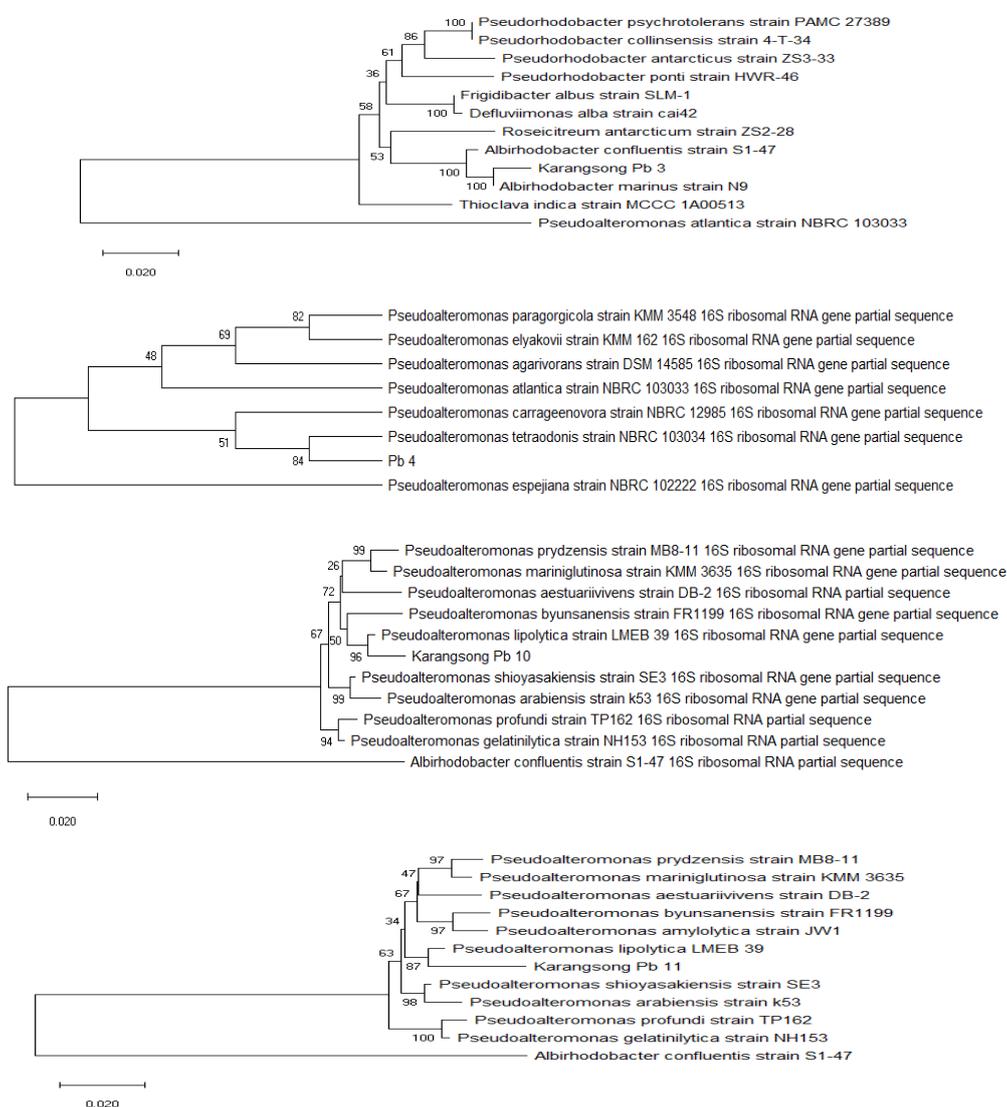
Bakteri ini merupakan bakteri gram negatif, berbentuk basil (batang) dan anaerob fakultatif. Lebar sel sekitar 0,5 – 0,8 mm dan panjang sekitar 1-2 mm, koloni berbentuk lingkaran dan halus, berdiameter 1-2 mm dan berwarna putih kekuningan. Bakteri ini tumbuh pada suhu berkisar antara 30°C - 37°C dengan suhu optimum sebesar 30°C dan pH optimum

sebesar 7,0 – 8,0. *Pseudoalteromonas lipolytica* mampu hidup pada salinitas 0,5 - 15%

Karakteristik biokimia dari *Pseudoalteromonas lipolytica* ini mampu menghidrolisis lemak, mampu mengoksidasi dan katalase, mampu mereduksi nitrat.

Analisis Filogenetik

Pohon filogenetik ini diperoleh dengan metode *neighbor-joining* dengan *Bootstrap* 1000 ulangan dalam program MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) software Versi 6.0 (Tamura *et al.*, 2013) (Gambar 7).



Gambar 7. Pohon filogeni isolat bakteri Pb 3, Pb 4, Pb 10 dan Pb 1 berbasis sekuen 16S rRNA metode neighbour-joining, bootstrap 1000x

Menurut Muzzazinah (2017) metode *neighbor-joining* merupakan dasar pembuatan pohon filogenetik berdasarkan perbedaan antara dua sekuen dimana pohon filogenetik dengan nilai bootstrap tinggi setidaknya diatas 70% merupakan pohon filogenetik yang baik. Berdasarkan pohon filogenetik tersebut sekuens Pb 3 menunjukkan membentuk garis keturunan filogenetik yang ketat dengan *Albirhodobacter marinus* strain N9T. Hal ini dibuktikan oleh nilai *bootstrap* antara kedua sekuen tersebut yang tinggi yaitu 100% dan

max identity sebesar 98%. Persentase nilai *bootstrap* 100% menandakan bahwa dari 1000 kali rekonstruksi pohon filogenetik ini, sekuen MI.P1.B mempunyai kekerabatan 100% dengan spesies bakteri *Albirhodobacter marinus* strain N9.

Sekuens Pb 4 tidak menunjukkan kekerabatan yang dekat dengan spesies *Pseudoalteromonas tetraodonis* strain NBRC 103034. Nilai bootstrap diantara kedua sekuen tersebut yakni 84% dengan nilai identity 81%, artinya dari 1000 kali rekonstruksi

pohon filogeni sekuens Pb 4 memiliki kekerabatan 84% dengan *Pseudoalteromonas tetraodonis* strain NBRC 103034.

Sekuens Pb 10 memiliki kekerabatan yang dekat dengan spesies *Pseudoalteromonas lipolytica* strain LMEB 39. Nilai bootstrap diantara kedua sekuens tersebut, yakni 90% dengan nilai identity 98%, artinya dari 1000 kali rekonstruksi pohon filogeni sekuens Pb 10 memiliki kekerabatan 90% dengan *Pseudoalteromonas lipolytica* strain LMEB 39.

Sekuens Pb 11 memiliki kekerabatan yang dekat dengan spesies *Pseudoalteromonas lipolytica* strain LMEB 39. Nilai bootstrap diantara kedua sekuens tersebut, yakni 83% dengan nilai identity 92%, artinya dari 1000 kali rekonstruksi pohon filogeni sekuens Pb 11 memiliki kekerabatan 83% dengan *Pseudoalteromonas lipolytica* strain LMEB 39.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Bakteri dari air pori sedimen dari Pantai Karangsong mampu mereduksi logam timbal (Pb) dari konsentrasi $1,5 \text{ mgL}^{-1}$ menjadi $0,364 \text{ mgL}^{-1}$ dengan nilai efisiensi sebesar 75,7%. Terdapat empat isolat bakteri pereduksi konsentrasi logam timbal (Pb) asal sedimen pantai Karangsong, yakni isolat Pb 3 identik dengan *Albirhodobacter marinus* strain N9 (Acc. No. NR 126203.1) dengan nilai identity 98% dan nilai kekerabatan 100%, isolat Pb 4 dengan *Pseudoalteromonas tetraodonis* strain NBRC 103034 (Acc. No. NR 114187.1) dengan nilai identity 81% dan nilai kekerabatan 84%, isolat Pb 10 dengan *Pseudoalteromonas lipolytica* strain LMEB 39 (Acc. No. NR 116629.1) dengan nilai identity 98% dan nilai kekerabatan 96% dan isolat Pb 11 dengan *Pseudoalteromonas lipolytica* strain LMEB 39 (Acc. No. NR 116629.1) dengan nilai identity 93% dan nilai kekerabatan 87%.

Saran

Saran dari hasil riset yang telah dilakukan yaitu perlu adanya riset lebih lanjut untuk mengetahui mekanisme reduksi logam timbal. Selain itu, bakteri pereduksi konsentrasi logam timbal (Pb) yang telah diketahui jenis dan kekerabatannya perlu dilakukan uji konsorsium.

DAFTAR PUSTAKA

Ahmad, R. Z. 2018. *Mycoremediation to Remove Heavy Metal Pollution in Post-Mining Areas for Farmland Utilization*.

Jurnal Wartazoa, 28(1), 41–50.

Azizah, S. N., A. Nuryanto, & H. Pramono. 2015. Karakterisasi Molekuler Ikan Gurami Soang (*Osphronemus goramy* Lac.) berbeda ukuran menggunakan Pcr-Rflp Gen Sitokrom C Oksidase 1. *Biosfera* 32 (3), 185-193. Ahmad, R. Z. (2018). Mikoremediasi menghilangkan polusi logam berat pada lahan bekas tambang untuk lahan peternakan. *Wartazoa*, 28(1), 41–50. Retrieved from <http://medpub.litbang.pertanian.go.id/index.php/wartazoa/article/view/1785/1550>

Azizah, S. N., A., Nuryanto, & H. Pramono. (2015). Karakterisasi Molekuler Ikan Gurami Soang (*Osphronemus goramy* Lac.) berbeda ukuran menggunakan Pcr-Rflp Gen Sitokrom C Oksidase 1. *Biosfera*, 3(32), 185–193.

Bowman, J. P., & McMeekin, T. A. (2005). *Genus XI. Pseudoalteromonas Gauthier, Gauthier and Christen 1995a, 759VP. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2nd ed.; D. J. Brenner, J. T. N. R. Krieg, Staley, & G. M. Garrity., Eds.). New York: Springer.

Deskawati, E., & Purwaningsih, S. P. (2014). Karakterisasi Dan Uji Toksisitas Ikan Buntal Dari Perairan Pameungpeuk, Jawa Barat. *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Kelautan Tropis*, 6(1), 101–107.

Drancourt, M. Bollet, C. Carliz, A. Martelin, R. Gayral, J. Roult, D. (2000). 16S ribosomal DNA sequene analysis of a large collection of enviromental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J Clin Microbiol*, 38, 3623–3630.

Fatchiyah, E. L., Arumingtyas, S., Widarti, S., & Rahayu. (2011). *Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analisis*. Jakarta: Erlangga.

Gauthier, G., Gauthier, M., & Christen, R. (1995). Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of tw. *Int Journal Syst Bacteriol*, 755–761.

Hidayat, N., Meitiniati, I., & Yuliana, N. (2018). *Mikroorganisme dan Pemanfaatannya* (1st ed.). Malang, Indonesia: UB Press.

Hughes, M. N., & Rolle, R. K. (1989). *Metals and Micro-organisms*. London, UK: Chapman & Hall.

Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2002). *Bacterial*

- Identification For Publication: When Is Enough Enough? *Journal Of Clinical Microbiology*, 40(6), 1887–1891. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.6.1887>
- Lefèvre, C. T., Viloria, N., Schmidt, M. L., Pósfai, M., Frankel, R. B., & Bazylinski, D. A. (2011). Novel magnetite-producing magnetotactic bacteria belonging to the Gammaproteobacteria. *The ISME Journal*, 6, 440. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.97>
- Lizayana, Mudatsir, & Iswadi. (2016). Densitas Bakteri pada Limbah Cair Pasar Tradisional. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Pendidikan Biologi*, 1(1), 95–106.
- Madigan, M. T. M. J. M. P. J. (1997). *Brock, the Biology of Microorganisms* (8th ed.). New Jersey: Upper saddle River.
- Mihdir, A. (2016). Detection, Identification and Characterization of Some Heavy Metals Tolerant Bacteria. *Microbial and Biochemical Technology*, 8(3), 226–230.
- Muzzazinah. (2017). Metode filogenetik pada indigofera. *Prosiding Seminar Nasional Pendidikan Biologi Dan Biologi*, 25–40.
- Nikunj Kumar, B., & Dhruvil. (2012). *Molecular Identification of Bacteria Using 16S rDNA Sequencing*. Gujarat University.
- Nupur, Vaidya, B., Tanuku, N. R. S., & Pinnaka, A. K. (2013). *Albirhodobacter marinus* gen. nov., sp. nov., a member of the family Rhodobacteraceae isolated from sea shore water of Visakhapatnam, India. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 103(2), 347–355. <https://doi.org/10.1007/s10482-012-9814-z>
- Nursyirwani, & Amolle, K. C. (2007). Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Hidrokarbonoklastik dari Perairan Dumai dengan Sekuen 16S rDNA. *Jurnal Ilmu Kelautan*, 12(1), 12–17.
- Rochyatun, E., Kaisupy, T. M., & Rozak, A. (2006). Distribusi Logam Berat dalam Air Dan Sedimen di Perairan Muara Sungai Cisadane. *Jurnal Makara*, 1(10), 35–40.
- Sabbathini, G. C., Wijanarka, Pujiyanto, S., & Lisdiyanti, P. (2017). Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Genus Sphingomonas Dari Daun Padi (*Oryza Sativa*) Di Area Persawahan Cibinong. *Jurnal Biologi*, 6(1), 59–64.
- Simidu, U., Kita-Tsukamoto, K., Yasumoto, T., & Yotsu, M. (1990). Taxonomy of Four Marine Bacterial Strains That Produce Tetrodotoxin. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40(4), 331–336. <https://doi.org/10.1099/00207713-40-4-331>
- Stackebrandt, E., & B.M. Goebel. (1995). A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in The Present Species Definition in Bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, (44), 846–849.
- Susana, T. (2009). Tingkat Keasaman (Ph) Dan Oksigen Terlarut Sebagai Indikator Kualitas Perairan Sekitar Muara Sungai Cisadane). *Jurnal Teknologi Lingkungan*, 5(2), 33–39. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1067278>
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipksi, A., & Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Bio and Evol*, 30, 2725–2729.
- Ward, D. . (1998). A natural spesies concepts for procaryotes. *Mlcrobiology*, 1, 271–277.
- Wardani, A. K., Arlisyah, A., Fauziah, A., & Fa'ida, T. N. (2017). Identifikasi Gen Transgenik pada Produk Susu Bubuk Kedelai dan Susu Formula Soya dengan Metode PCR (Polymerase Chain Reaction) Identification of Transgenic Genes in Soy Milk Powders and Soy Formulas with Polymerase Chain Reaction (PCR) Technique. *AGRITECH*, 37(3), 237–245. <https://doi.org/10.22146/agritech.16656>
- Weeden, N. F., Timmerman, G.M., Hemmat, M., Kneen, B. E., & Lodhi, M. A. (1992). Inheritance and reliability of RAPD markers In applications of RAPD technology to plant breeding. *Symposium Proceedings*. Madison, WI: Crop Science Society of America.
- Wu, M., Wang, X.-G., Wang, C.-S., Wu, Y.-H., Xu, X.-W., & Gao, X.-H. (2010). *Pseudoalteromonas lipolytica* sp. nov., isolated from the Yangtze River estuary. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(9), 2176–2181. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.017673-0>
- Wulandari SY, Yulianto B, Santosa GW, dan S. K. (2009). Kandungan Logam Berat Hg dan Cd dalam Air, Sedimen dan Kerang Darah (*Anadara granosa*) dengan Menggunakan Metode Analisis Pengaktifan Neutron (APN). *Ilmu Kelautan*, 14(3), 170–175.