

Isolasi dan Seleksi Bakteri Penghasil Enzim Ekstraseluler (proteolitik, amilolitik, lipolitik dan selulolitik) yang Berasal dari Sedimen Kawasan Mangrove

Wills Ari Setyati* dan Subaglyo

Laboratorium Ilmu Kelautan, Program Studi Ilmu Kelautan,
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro
Kampus Tembalang, Semarang, Indonesia. Telp 024 7474698, Email: wilisarsetyati@yahoo.co.id

Abstrak

Bioremediasi tambak udang memegang peranan penting dalam upaya membersihkan tambak dari bahan pencemar internal yang dihasilkan selama proses budidaya itu sendiri. Proses budidaya udang merupakan kegiatan yang potensial menghasilkan limbah organik terutama berasal dari sisa pakan dan hasil ekskreta (feses). Bakteri heterotrofik memiliki kemampuan untuk menghasilkan enzim ekstraseluler yang diperlukan untuk bioremediasi limbah organik. Penelitian ini ditujukan untuk mengisolasi bakteri heterotrofik yang berasal dari ekosistem mangrove untuk dikembangkan sebagai agensia bioremediasi limbah organik pada tambak udang. Sedimen mangrove diperoleh dari kawasan mangrove Segara Anakan- Cilacap dan kawasan Mangrove Kaliuntu-Kabupaten Rembang. Isolasi dilakukan dengan metode agar tuang menggunakan media Zobell agar. Pengujian aktivitas proteolitik, amilolitik, lipolitik dan selulolitik dilakukan dengan metode diffusion agar menggunakan paper disk berturut-turut pada media Zobell agar yang diperkaya dengan 1% skim milk, 1% amilum, dan 1% tween 80 dan 1% CMC. Diameter zone hidrolitik digunakan sebagai dasar untuk melakukan seleksi. Hasil penelitian diperoleh 35 isolat (16 isolat dari Kaliuntu - Rembang dan 19 isolat dari Segoro Anakan - Cilacap). Jumlah isolat yang mempunyai kemampuan menghasilkan enzim ekstraseluler berturut-turut 33 isolat dengan aktivitas proteolitik 25 isolat dengan aktivitas amilolitik, 29 isolat dengan aktivitas lipolitik, dan 12 isolat dengan aktivitas selulolitik. Hasil seleksi berdasarkan diameter zone hidrolitik diperoleh 10 isolat yang potensial untuk dikembangkan sebagai agensia bioremediasi.

Kata kunci: proteolitik, amilolitik, lipolitik, selulolitik, mangrove, bioremediasi, tambak udang

Abstract

Isolation and Selection of Extracellular Enzyme Producing Bacteria (proteolytic, amylolytic, lipolytic and cellulolytic) Originating from Mangrove Sediment

Bioremediation of shrimp pond plays an important role in the effort to clean up the internal pollutants of pond produced during the cultivation process. Shrimp farming produces mainly organic waste from food remains and the excreta. Heterotrophic bacteria have the ability to produce extracellular enzymes required for the bioremediation of organic waste. This study aimed to isolate heterotrophic bacteria from mangrove ecosystem to be developed as agents of bioremediation of organic wastes in shrimp ponds. This was done by isolating and selecting bacteria producing extracellular enzymes of proteolytic, amylolytic, lipolytic and cellulolytic from mangrove sediments collected from the mangrove area of Segara Anakan at District of Cilacap and Kaliuntu, district of Rembang. Isolations were done by pour-plate method using a Zobell agar medium. Assays for proteolytic, amylolytic, lipolytic and cellulolytic activity were performed using paper disk on Zobell agar medium enriched respectively with 1% skim milk, 1% soluble starch, 1% tween 80 and 1% CMC. Hydrolytic zone diameter was used as the basis for selection of enzymatic activities. The results obtained was 35 isolates (16 isolates from Kaliuntu-Rembang dan 19 isolate from Segara Anakan - Cilacap), consisting of 33 proteolytic enzyme, 25 amilolytic enzyme, 29 lipolytic enzyme and 12 isolates cellulolytic producing enzyme. Based on hydrolytic zone diameter were selected 9 isolates which potential to be developed as bioremediation agent.

Key words: Bioremediation, proteolytic, amilolytic, lipolytic, selulolytic

Pendahuluan

Budidaya udang merupakan kegiatan yang potensial menghasilkan limbah organik yang terutama berasal dari sisa pakan dan kotoran udang. Berdasarkan hasil penelitian Jackson (2003)

menunjukkan bahwa efisiensi penggunaan nitrogen pakan adalah sekitar 22%, yang berarti ada sekitar 78% Nitrogen dibuang ke lingkungan. Selama proses kegiatan budidaya sebagian besar limbah organik ini akan terakumulasi di sedimen dasar tambak (Nimrat et al. 2008). Akumulasi bahan organik ini menjadi salah satu faktor utama terjadinya kematian massal udang. Kandungan bahan organik yang tinggi akan memacu proses biodekomposisi, pertumbuhan mikroorganisme dan konsumsi oksigen (Avnimelech dan Ritvo, 2003). Hal ini akan mengakibatkan penurunan kandungan oksigen dan proses dekomposisi aerob akan bergeser ke dekomposisi anaerob yang menghasilkan produk-produk anaerob seperti H₂S dan ammonia. Keberadaan H₂S berpengaruh menurunkan daya tahan udang *P. vannamey* terhadap pathogen *Vibrio alginolyticus* (Hsu dan Chen, 2007).

Hasil penelitian Mugnier et al. (2008) lebih lanjut menunjukkan adanya interaksi yang sinergis antara senyawa hasil metabolisme anaerob khususnya amonia dengan kondisi lingkungan yang anaerob untuk meningkatkan pengaruh fisiologi udang *L. stylirostris*. Hal ini perlu dilakukan upaya untuk mengeluarkan bahan organik yang telah terakumulasi di sedimen tambak. Pendekatan yang paling efektif adalah melalui bioremediasi, yang merupakan proses pembersihan lingkungan dari bahan-bahan pencemar secara biologis oleh kerja agensia biologi, terutama mikroorganisme. Pencemaran itu berasal dari pakan, maka bahan organik yang terakumulasi bersifat kompleks, sehingga untuk meningkatkan efektifitas kerja bioremediasi diperlukan suatu konsorsium mikroorganisme yang terdiri dari berbagai jenis dengan aktivitasnya masing-masing untuk membersihkan bahan organik.

Materi dan Metode

Pengambilan sampel sedimen

Pengambilan sampel sedimen dilakukan di eksosistem mangrove Kaliuntu, Kabupaten Rembang dan Segara Anakan, Kota Cilacap. Sampel sedimen di masing masing ekosistem diambil menggunakan *soil sampler* pada kedalaman ± 10 cm kemudian dimasukan ke dalam plastik sampel. Selanjutnya sampel di masukan ke dalam *cool box* dan dibawa ke laboratorium.

Pembuatan media Zobell 2216 E

Media Zobell 2216E (15,0gr Bakto-agar, 5,0 gr Bakto-pepton, 1,0 gr yeast ekstrak dan air laut steril hingga mencapai volume 1 liter) digunakan sebagai media isolasi bakteri dengan pH diatur hingga 7,5-7,6.

Penanaman bakteri

Metode yang digunakan dalam penanaman bakteri adalah metode *Pour Plate* (Agar tuang) . Diambil 10 g dari masing-masing sampel, kemudian dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer yang berisi 90 ml air laut steril, digojog menggunakan vortex hingga homogen dan diperoleh pengenceran 10⁻¹. Selanjutnya dari pengenceran 10⁻¹ diambil 1 ml menggunakan pipet steril kemudian dimasukkan ke dalam 9 ml air laut steril dan diperoleh pengenceran 10⁻². Demikian selanjutnya dilakukan pengenceran hingga diperoleh pengenceran 10⁻⁵, 10⁻⁶ dan 10⁻⁷. Pada masing-masing pengenceran diambil 1 ml suspensi bakteri menggunakan pipet steril dan dimasukkan ke dalam masing-masing cawan petri steril. Selanjutnya di tambahkan ke dalamnya 20 ml media Zobell 2216 E (dengan suhu sekitar 45°C yang telah dicairkan sebelumnya) dan di ratakan. Selanjutnya cawan petri tersebut dibungkus dengan kertas pembungkus dan diinkubasikan selama 2 x 24 jam.

Pemisahan dan pemurnian isolat bakteri

Pemisahan dan pemurnian isolat bakteri dilakukan dengan metoda goresan (*streak method*). Masing-masing cawan petri pada tiap pengenceran diambil koloni-koloni bakteri yang menampilkan morfologi dan warna yang berbeda. Selanjutnya masing-masing koloni bakteri tersebut digoreskan pada permukaan media Zobell 2216 E steril pada masing-masing cawan petri yang telah disiapkan. Selanjutnya cawan-cawan petri tersebut diinkubasikan pada suhu kamar selama 2 x 24 jam dan diamati pertumbuhannya, apakah sudah terpisah dan menjadi kultur murni atau belum. Apabila masih terdapat campuran bakteri pada cawan petri tersebut, maka dilakukan pemisahan kembali dengan metode goresan hingga diperoleh kultur murni pada masing-masing cawan petri.

Pemeliharaan kultur murni

Kultur murni dari isolat bakteri tersebut dipindahkan ke dalam media agar miring Zobell 2216 E pada tabung reaksi dengan teknik goresan. Pemandahan dan pemeliharaan kultur dilakukan tiap 4 minggu sekali dengan cara mentransfer kultur murni tersebut ke dalam media agar miring yang baru.

Seleksi bakteri

Skrining dilakukan berdasarkan kemampuan mendegradasi polisakarida, protein dan lemak dengan pendekatan aktivitas enzim amylase, protease, selulase, dan lipase. Uji aktivitas produksi enzim amilase ekstraseluler dilakukan dengan prosedur menurut Bairagi et al. (2002). Kultur cair solat-isolat yang diperoleh dari hasil isolasi diinokulasikan ke *paper disc blank* yang telah diletakan pada media

Zobell 2216 E yang diperkaya dengan amilum (1%). Inkubasi pada 32°C selama 48 jam. Larutan lugol's iodine 1% dituang ke atas kultur untuk identifikasi aktivitas amylase, adanya aktivitas enzim amilase ditunjukkan oleh terbentuknya zona jernih disekitar *paper disc* dengan latar belakang biru gelap.

Uji aktivitas produksi enzim protease dilakukan dengan prosedur Bairagi *et al.* (2002). Kultur cair isolat-isolat yang diperoleh dari hasil isolasi diinokulasikan ke *paper disc blank* yang telah diletakan pada media Zobell 2216 E yang diperkaya dengan skim milk (1%) Inkubasi pada 32°C selama 15 jam. Aktivitas proteolitik ditunjukkan oleh terbentuknya zona jernih di sekitar paper disc dengan latar belakang putih.

Uji aktivitas produksi enzim lipase dilakukan dengan prosedur menurut Bairagi *et al.* (2002) yang dimodifikasi. Kultur isolat-isolat yang diperoleh dari hasil isolasi diinokulasikan ke *paper disc blank* yang telah diletakan pada media Zobell 2216 E yang diperkaya dengan Tween 80. Inkubasi pada 32°C selama 24 jam. Aktivitas lipase ditunjukkan oleh terbentuknya endapan asam lemak yang berwarna putih keruh disekitar paper disc.

Uji aktivitas produksi selulase dilakukan dengan medium agar diperkaya CMC. Kultur isolat-isolat yang diperoleh dari hasil isolasi diinokulasikan ke *paper disc blank* yang telah diletakan pada media Zobell 2216 E diperkaya CMC 1%. Larutan congo red dituang ke atas kultur untuk identifikasi aktivitas selulolitik. Adanya aktivitas enzim selulase ditunjukkan terbentuknya zona bening di sekitar paper disc dengan latar belakang merah muda.

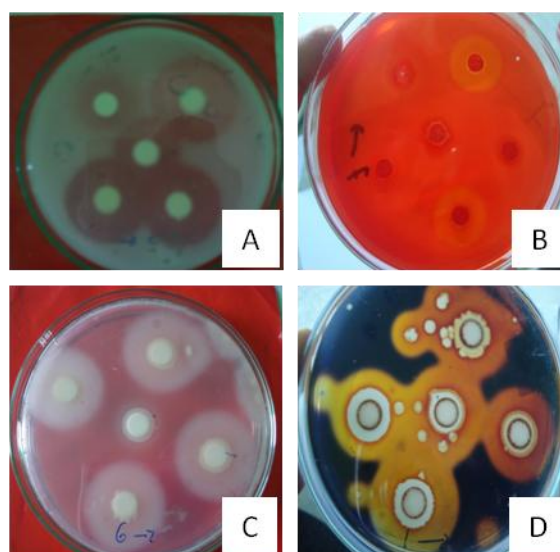
Hasil dan Pembahasan

Hasil isolasi dan seleksi bakteri heterotrofik yang mempunyai kemampuan menghasilkan enzim proteolitik (protease), amilolitik (amilase), lipolitik (lipase) dan selulolitik (selulase) terhadap sampel sedimen yang berasal dari ekosistem mangrove Kaliuntu-Kabupaten Rembang dan Segara anakan-Cilacap ditunjukkan pada Gambar 1 dan Tabel 1.

Berdasarkan hasil uji aktivitas proteolitik, amilolitik, lipolitik dan selulolitik (Tabel 1) diperoleh 33 isolat mempunyai aktivitas proteolitik, 25 isolat mempunyai aktivitas amilolitik, 29 isolat mempunyai aktivitas lipolitik, dan 12 isolat mempunyai aktivitas selulolitik. Berdasarkan asal sampel diperoleh 16 isolat dan 17 isolat bakteri proteolitik, 15 isolat dan 10 isolat bakteri amilolitik, 10 isolat dan 19 isolat bakteri lipolitik serta 6 isolat dan 6 isolat bakteri selulolitik berturut-turut berasal dari sedimen mangrove kabupaten Rembang dan Cilacap.

Berdasarkan kemampuan multiaktivitas diperoleh 2 isolat yang mempunyai aktivitas proteolitik, amilolitik, lipolitik dan selulolitik yaitu isolat yang berasal dari Cilacap (C-05 dan C-17). Jumlah total isolat yang hanya mempunyai kemampuan proteolitik, amilolitik dan lipolitik ada 19 isolat yaitu 10 isolat berasal dari Rembang dan 9 isolat dari Cilacap. Jumlah total bakteri yang hanya mempunyai aktifitas proteolitik, amilolitik dan selulolitik ada 4 isolat yang berasal dari Rembang.

Berdasarkan hasil pengukuran diameter zone hidrolitik diketahui bahwa dari seluruh isolat bakteri proteolitik mempunyai diameter zone hidrolitik



Gambar 1. Hasil isolasi dan seleksi bakteri heterotrofik. Hasil pengujian aktivitas (A) proteolitik (B) selulolitik, (C) lipolitik dan (D) amilolitik.

Tabel 1. Hasil seleksi bakteri heterofik yang berasal dari sedimen mangrove berdasarkan kemampuan proteolitik, amilolitik, lipolitik dan selulolitik

Lokasi	Kode Isolate	Aktivitas enzim (mm diameter zona hidrolitik)			
		Proteolitik	Amilolitik	Lipolitik	Selulolitik
Rembang	R-01	14+0	30,5±0,7	30+0	0
	R-02	18,5±0,7	29±1,4	30+0	0
	R-03	14,5±0,7	30±0	30,5±3,5	0
	R-04	11,5±0,7	26,5±2,1	31±1,4	0
	R-05	18,5±0,7	28,5±0,7	30±0	0
	R-06	11±0	24±0	28,5±3,5	0
	R-07	15±0	26,5±2,1	31±4,2	0
	R-08	11±0	26±2,8	31±0	0
	R-09	12±0	22,5±0,7	30±0	0
	R-10	17±1,4	17±1,4	29,5±0,7	0
	R-11	17±1,4	13±1,4	0	19±1,4
	R-12	17±2,8	29±1,4	0	18,5±3,5
	R-13	16,5±2,1	21,5±1,4	0	16±0
	R-14	18,5±0,7	24,5±2,1	0	16±0
	R-15	16,5±3,5	0	0	16±0
	R-16	17,5±0,7	23±0	0	22,5±2,1
Cilacap	C-01	21±1,4	0	16,5±2,1	0
	C-02	17,5±0,7	0	12,5±0,7	17,5±3,5
	C-03	16±1,4	0	13±0	19±4,2
	C-04	16±0	0	11±0	19±1,4
	C-05	16±0	16,5±0,7	13,5±0,7	18±0
	C-06	19±1,4	20±0	30±0	0
	C-07	20±0	23±0	30±0	0
	C-08	20,5±0,7	20±0	29,5±0,7	0
	C-09	11±0	22±0	29±0	0
	C-10	16,5±0,7	20±0	13,5±0,7	0
	C-11	9,5±0,7	12±0	8±0	0
	C-12	5,5±0,7	0	6,5±0,7	0
	C-13	6,5±0,7	0	8±0	0
	C-14	0	0	8,5±0	0
	C-15	0	0	11±1,4	0
	C-16	8±2,8	0	9±0	8±2,8
	C-17	6±1,4	18,5±0,7	7±0	6±1,4
	C-18	8±0	12±2,8	10,5±0,7	0
	C-19	9,5±0,7	15±0	11±1,4	0

berkisar 5.5–21 mm. Lima isolat yang mempunyai aktivitas paling tinggi adalah isolat C-01, C-07, C-08, R-02 dan R-05 berurut-turut mempunyai diameter zone hidrolitik sebesar 21 mm, 20 mm, 20,5 mm, 18,5 mm dan 18,5 mm.

Berdasarkan pengukuran diameter zone hidrolitik pada isolat-isolat dengan aktivitas amilolitik diperoleh kisaran diameter antara 12-30,5 mm. Lima isolat yang mempunyai aktivitas amilolitik tertinggi adalah R-01, R-02, R-03, R-05 dan R-12 berturut-turut dengan diameter zone hidrolitik sebesar 30,5 mm, 29 mm, 30 mm, 28,5 mm, dan 29 mm. Sedangkan berdasarkan diameter zone hidrolitik bakteri dengan aktivitas lipolitik berkisar antara 6.5 mm - 31, 5 mm. Lima isolat dengan aktivitas lipolitik tertinggi adalah R-01, R-03, R-04, R-07 dan R-08 yaitu berturut-turut 30 mm, 30.5 mm, 31 mm, 31, 5 mm dan 31 mm.

ditunjukkan oleh diameter zone hidrolitik menunjukan nilai berkisar antara 6 mm - 22,5 mm. Lima isolat selulolitik yang mempunyai aktivitas tertinggi yaitu R-11, R-16, C-03, C-04 dan C-05.

Budidaya udang dan budidaya perikanan lainnya merupakan kegiatan yang potensial menghasilkan limbah organik yang tinggi. Selama proses kegiatan budidaya sebagian besar limbah organik ini akan terakumulasi di sediment dasar tambak (Nimrat *et al.*, 2008). Limbah ini berasal terutama dari sisa pakan dan hasil ekskreta hewan budidaya, sehingga mempunyai karakteristik yang mirip dengan komposisi pakan yang digunakan. Pakan udang kaya akan nitrogen, selain itu pakan udang juga mengandung komponen karbohidrat diantaranya adalah selulosa. Lipid juga terdapat dalam pakan meskipun dalam jumlah yang relatif

lebih sedikit, maka isolat-isolat yang telah berhasil diisolasi dan diseleksi berdasarkan kemampuan mendegradasi protein, amilum, lipid dan selulose mempunyai potensi untuk dikembangkan sebagai agensia bioremediasi pencemaran bahan organik di tambak.

Ekosistem mangrove mempunyai keanekaragaman mikroorganisme yang mempunyai kemampuan menghasilkan enzim ekstraseluler yang diperlukan untuk perombakan bahan organik. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa bakteri heterotropik di ekosistem mangrove merupakan sumber utama enzim ekstraseluler yang diperlukan untuk mineralisasi bahan organik diantaranya menghasilkan enzim amilase, protease, esterase dan lipase (Dias *et al.*, 2009), Hasil penelitian Mahasneh (2001) mendapatkan bahwa dominansi aktivitas perombakan bahan organik (dalam hal ini adalah seresah daun *Avicenia*) tertinggi adalah amilolitik dan diikuti proteolitik, selulolitik, dan lipolitik. Akan tetapi hasil penelitian Raghavendrudu dan Kondalarao (2008) mendapatkan hasil yang sebaliknya yaitu bahwa densitas tertinggi bakteri mangrove adalah bakteri lipolitik.

Hasil penelitian ini menunjukkan hampir semua isolat yang diperoleh mempunyai aktivitas proteolitik. Bakteri yang mempunyai aktivitas proteolitik mempunyai kemampuan untuk menghasilkan enzim protease yang disekresikan ke lingkungannya. Enzim proteolitik ekstraseluler ini selanjutnya bekerja menghidrolisis senyawa-senyawa bersifat protein menjadi oligopeptida, peptida rantai pendek dan asam amino. Diameter zone hambat yang terbentuk dapat menunjukkan secara kualitatif tingginya kemampuan proteolitik enzim protease yang dihasilkan atau juga tingginya jumlah enzim yang diproduksi dan dilepas keluar. Keberadaan enzim protease ekstraseluler ini sangat penting bagi kehidupan bakteri karena menyediakan kebutuhan senyawa bernitrogen yang dapat diangkut ke dalam sel. Jenis-jenis bakteri yang mempunyai kemampuan mensekresikan enzim protease ini memiliki potensi yang besar untuk digunakan sebagai agensia pembersih bahan pencemar yang bersifat protein. Pakan udang kaya akan protein sehingga sisa pakan dan produk ekskreta juga mengandung protein tinggi. Maka keberadaan enzim protease ekstraseluler ini akan merombak senyawa-senyawa protein ini menjadi senyawa sederhana yang langsung dapat digunakan oleh bakteri sebagai komponen nutrisinya untuk pertumbuhannya.

Pakan udang yang menggunakan komponen nabati sebagai bahan baku pakan seperti tepung kedelai, katul dan juga bahan perekat seperti CMC

mengandung karbohidrat dalam jumlah yang cukup besar. Komponen karbohidrat ini diantaranya adalah amilum dan selulosa. Amilum lebih mudah dicerna daripada selulosa. Amilum dicerna oleh enzim amilase. Bakteri amilolitik yang diperoleh dari penelitian ini adalah bakteri yang menghasilkan enzim amilase ekstraseluler. Enzim ini dibutuhkan untuk merombak amilum yang terdapat dalam sisa pakan. Sedangkan selulosa bersifat tidak dapat dicerna oleh enzim pencernaan udang, sehingga dikeluarkan kembali dalam bentuk feses udang. Perombakan selulosa di lingkungan diperlukan enzim selulase. Menurut Kumar *et al.* (2008) selulase dikelompokkan menjadi 3 kelompok utama yaitu endoglukanase, sellobiohidrolase (exoglukanase), dan β -glukosidase. Enzim endoglukanase mengkatalisis pemecahan ikatan internal rantai selulosa secara random. Sedangkan sellobiohidrolase menghidrolisis ujung rantai dan membebaskan selobiosa. Enzim β -glukosidase hanya aktif terhadap selo-oligosakarida dan selobiosa, dan melepaskan monomer glukosanya. Seleksi aktivitas hidrolitik terhadap lipid yang ditunjukkan dengan terbentuknya endapan asam lemak menunjukkan bahwa isolat bakteri mempunyai kemampuan menghasilkan enzim lipolitik (lipase). Enzim ini merombak lipid menjadi lipid rantai pendek dan asam lemak, yang selanjutnya akan digunakan untuk pertumbuhan bakteri.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil pengukuran zona hidrolitik dan jumlah enzim hidrolitik ekstraseluler yang dihasilkan dapat diseleksi kandidat bakteri probiotik yang dapat dikembangkan sebagai konsorsium probiotik untuk membersihkan tambak udang dari bahan organik. Pada penelitian ini telah dapat diseleksi 10 isolat bakteri yang mempunyai potensi untuk dikembangkan sebagai agensia bioremediasi tambak udang, karena mempunyai kemampuan untuk menghasilkan enzim proteolitik, amilolitik, lipolitik dan selulolitik.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan Nasional, sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Penelitian Multi Tahun Anggaran 2011, melalui DIPA Nomor: 0596/023-04.2-16/13/2011 tanggal 20 Desember 2010

Daftar Pustaka

Ajitha, S., M,Sridhar., N, Sridhar., I.S.B., Singh & V. Vargheshe. 2004. Probiotic effects of lactic acid bacteria. *Asian Fisheries Soc.* 17: 71-80.

- Avnimelech Y. & G. Ritvo. 2003. Shrimp and fish pond soils: processes and management . *Aquaculture*. 220: 549-567
- Bairagi, A., K. Ghosh, S. Kumarsen, & A. K. Ray. 2002. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. *Aquaculture International*. 10: 109-121.
- Baskar P.V., & Kannan S. 2009, Marine Bacteria as Probiotics to Control Pathogenic Vibrio on Infected Shrimp. *Academic Review* 1 & 2 SB: 77-85.
- Bender J. and P. Phillips. 2004. Microbial mats for multiple applications in aquaculture and bioremediation. *Bioresourse Tech*. 94: 229-238.
- Cao H, S. He, R. Wei, M. Diong, & L. Lu, 2011, *Bacillus amyloliquefaciens* G1: A Potential Antagonistic Bacterium against Eel-Pathogenic *Aeromonas hydrophila*, *Evid.-Based Complementary and Alternative Medicine*: 2011:1-7. doi: 10.1155/2011/824104
- Dias A. C. F., F. D. Andreote, F. Dini-Andreote, P. T. Lacava, A. L. B. Sa, I. S. Melo, J. L. Azevedo, W. L. Araujo. 2009. Diversity and biotechnological potential of culturable bacteria from Brazilian mangrove sediment. *World J Microbiol Biotechnol*. 25:1305-1311.
- Garno SY. 2004. Biomanipulasi paradigma baru dalam pengendalian limbah organik pada budidaya perikanan di waduk dan tambak. Orasi ilmiah Pengukuhan Ahli Peneliti Utama. Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi. Jakarta. P.58.
- Haryanti, G. N. Permana, S. B. Moria, N. A. Giri, & K. Sugana. 2002. Penggunaan Bakteri Probiotik *Alteromonas* sp. BY-9 dalam Pemeliharaan Larva Udang Melalui Pakan Alami dan Buatan. *J. Penelitian Perikanan Indonesia*. 8: 55-66.
- Hsu, S.E. & Chen, J.C .2007. The immune response of white shrimp *Penaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under sulfide stress. *Aquaculture*. 271: 61-69.
- Jackson C, Preston N, Thompson P.J, & Burford M. 2003. Nitrogen Budget and Effluent Nitrogen Components at an Intensive Shrimp Farm. *Aquaculture*. 218: 397- 411.
- Mahasneh A.M. 2001. Bacterial Decomposition of *Avicennia marina* Leaf Litter from Al-khor (Qatar-Arabian Gulf), *J. Biol. Sci*.
- Mugnier C, E. Zipper, C. Goartant & H. Lemonnier. 2008. Combined effect of exposure to ammonia *Litopenaeus stylirostris* survival and physiological response in relation to molt stage. *Aquaculture*. 274 : 398-40.
- Nimrat S, S. Suksawat, P. Maleeweach & V. Vuthiphandchai. 2008. Effect of different shrimp pond bottom soil treatments on the change of physical characteristics and pathogenic bacteria in pond bottom soil . *Aquaculture*. 285: 123-129.
- Raghavendrudu, G., & B. Kondalarao. 2008. Density of heterotrophic bacteria in Meghadri mangrove ecosystem, Visakhapatnam, east coast of India, *J. Mar. Biol. Ass. U.K*. 50: 106-109.
- Setyati, W.A. 2000. Sukses Populasi Mikroorganisme Selama Proses Dekomposisi Seresah Daun *Rhizophora stylosa* dan *Avicennia alba* Dalam Lingkungan Mangrove di Desa Semat Jepara. *Ilmu Kelautan*. 9(4):187-195.