

## Studi Metagenomik Sampel Perairan yang Diperkaya dari Wilayah Hilir Sungai Citarum dan Potensinya sebagai Agen Bioremediasi

### *Metagenomics Study of Enriched Water Samples from Citarum River Downstream and Their Potency as Bioremediation Agent*

Fadia Mutiara Prastianti<sup>1\*</sup>, Eri Bachtiar<sup>2</sup>, Muhammad Wahyudin Lewaru<sup>2</sup>, dan Moch Untung Kurnia Agung<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Program Studi Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Padjadjaran  
Jl. Raya Bandung-Sumedang KM. 21 Jatinangor, Kabupaten Sumedang, 45363, Indonesia

<sup>2</sup> Departemen Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Padjadjaran  
Jl. Raya Bandung-Sumedang KM. 21 Jatinangor, Kabupaten Sumedang, 45363, Indonesia

\*Korespondensi penulis : mutiarafadia@gmail.com

Diterima: 8 Juli 2021; Direvisi: 7 Desember 2021; Disetujui: 13 April 2022

#### ABSTRAK

Perairan Sungai Citarum banyak memperoleh limpasan limbah antropogenik dari darat yang dapat menimbulkan pencemaran lingkungan. Untuk mengatasi masalah pencemaran tersebut, bakteri dapat dimanfaatkan sebagai agen bioremediasi. Hingga saat ini belum tersedia informasi komunitas bakteri di Perairan Sungai Citarum, khususnya dari wilayah hilir Muara Gembong. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi komunitas, kelimpahan, dan keanekaragaman bakteri dari Perairan Muara Gembong yang telah diperkaya dengan pendekatan metagenomik, serta analisis fungsional dengan melihat profil protein yang dimiliki dari bakteri yang teridentifikasi yang berpotensi sebagai agen bioremediasi. Pengambilan sampel air dilakukan di dua lokasi (A1 dan A2) dengan karakteristik perairan yang berbeda. Sampel air estuari diperkaya dengan 0,2x *Nutrient Broth*. Sekuensing dilakukan dengan metode *Next Generation Sequencing* (NGS) menggunakan amplicon sekuensing platform *Novaseq Illumina*, dengan primer 16S rRNA region V3–V4 (341F dan 806R). Hasil identifikasi menunjukkan terdapat 37 genera, 19 famili, 13 ordo, 7 kelas, dan 4 filum bakteri dengan 49 OTU untuk sampel A1 dan 48 OTU untuk sampel A2. Kelimpahan tertinggi diperoleh pada kelas *Gammaproteobacteria* (99,82%) yang didominasi oleh genus *Vibrio*. Keanekaragaman bakteri pada kedua sampel diperkaya ini tergolong sedang dengan tingkat dominasi tinggi. Analisis fungsional menunjukkan kemampuan bakteri yang teridentifikasi mampu mendegradasi benzoat, dioxin, asam lemak, metana, naftalen, nitrotoluen, PAH, dan sulfur dengan protein dan enzim yang terlibat dalam metabolisme tersebut. Penelitian ini menunjukkan bakteri yang teridentifikasi pada Perairan Muara Gembong mempunyai potensi bioremediasi untuk cemaran lingkungan, seperti polutan organik dari logam berat.

**Kata Kunci : bioremediasi, identifikasi, metagenomik, Muara Gembong, next generation sequencing**

#### ABSTRACT

*Muara Gembong waters is a downstream region of the Citarum watershed that receives anthropogenic runoff and affects water pollution. To overcome the problem of pollution, bacteria can be used as a bioremediation agent. Until now, information on the bacterial community in Citarum River waters has not been obtained, especially in the downstream area of Muara Gembong. This study aims to identify the community, abundance, and diversity of bacteria from Muara Gembong waters that have been enriched with a metagenomic approach, as well as functional analysis by looking at the protein profiles of the identified bacteria that have the potential as bioremediation agents. Water samples were taken at two locations (A1 and A2) with different water characteristics. Estuary water samples were enriched with 0.2x Nutrient Broth (NB). Amplicon sequencing of NGS by Novaseq Illumina platform was used in this research, using 16S rRNA primer region V3-V4 (341F and 806R). The results showed that 37 genera, 19 families, 13 orders, 7 classes, and 4 bacterial phyla were identified with 49 OTUs for A1 and 48 OTUs for A2. The highest abundance was obtained by the Gammaproteobacteria class (99.82%) which dominated by the Vibrio genera. The diversity level is classified as medium diversity with high dominance. Functional analysis showed the ability of the identified bacteria to degrade benzoate, dioxin, fatty acid, methane, naphthalene, nitrotoluene, PAH, and sulfur with proteins and enzymes involved in the metabolism. This study shows that identified bacteria in Muara Gembong waters are potentially applicable for bioremediation of the environment contaminants, such as organic pollutants and heavy metals.*

**Keywords: bioremediation, identification, metagenomic, Muara Gembong, next generation sequencing**

## PENDAHULUAN

Estuari merupakan wilayah perairan semi tertutup sebagai tempat pertemuan massa air laut dan air tawar dengan tingkat kerentanan yang tinggi terhadap beban pencemar (Rastina, 2012). Berbagai aktivitas antropogenik seperti pembangunan industri dan pusat ekonomi di sepanjang daerah aliran sungai (DAS) dapat meningkatkan potensi pencemaran lingkungan (Praditya, 2011).

Aliran Sungai Citarum bermuara di Muara Gembong, Kabupaten Bekasi, Jawa Barat, memiliki kondisi topografi wilayah hilir landai dan berbatasan langsung dengan laut Jawa yang memiliki karakteristik perairan yang tenang (Hidayatullah et al., 2016). DAS Citarum yang bermuara di Muara Gembong sering memperoleh masukan bahan pencemar dari aktivitas rumah tangga dan industri. Sebagai contoh, Dinas Kinerja Lingkungan Hidup Daerah Kota Cimahi mencatat sebanyak 2.822 Unit industri di bantaran Sungai Citarum, serta terjadi perubahan lahan menjadi permukiman seluas  $\pm 4.300$  ha yang berpotensi menyumbang limbah ke badan perairan (Ridwan, 2014). Selain itu juga terjadi konversi lahan mangrove menjadi tambak-tambak dan kilang minyak di Muara Gembong (Hidayatullah et al., 2016).

Masukan bahan pencemar ke badan perairan Sungai Citarum dapat menurunkan kualitas perairan yang berdampak pada komunitas bakteri perairan. Kondisi perairan yang tercemar dapat diatasi menggunakan agen bioremediasi yang memanfaatkan mikroorganisme *indigenous* perairan. Mikroorganisme *indigenous* dapat dideteksi, identifikasi, dan diagnosis melalui teknik molekuler dengan pendekatan metagenomik (Harvell et al., 2010) yang selanjutnya dilihat potensi degradasi polutan organik perairan berdasarkan jalur metabolisme yang dimilikinya.

Saat ini belum ada informasi komunitas bakteri dari Perairan Muara Gembong, sehingga perlu dilakukan studi metagenomik bakteri sebagai langkah awal tahapan bioremediasi lingkungan. Tujuan penelitian ini untuk mengidentifikasi komunitas, kelimpahan, dan keanekaragaman bakteri dari Perairan Muara Gembong yang telah diperkaya dengan pendekatan metagenomik. Selanjutnya, dilakukan analisis fungsional berdasarkan sekuens komunitas bakteri yang terlibat dalam degradasi polutan organik di perairan.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan

Sampel air diambil pada kedalaman  $\pm 20$  cm di Perairan Muara Gembong, Kabupaten Bekasi,

Jawa Barat pada 2 lokasi berbeda (A1 dan A2). Lokasi pengambilan sampel A1 diambil pada titik 5°56'13,6" S; 106°59'41,0" E sebagai tempat pendaratan ikan hasil tangkapan para nelayan dan permukiman warga. Sampel A2 diambil pada titik 5°56'31,7" S; 106°59'18,4" E yang merupakan ekosistem mangrove yang dijadikan sebagai tempat singgah burung, yang mewakili keseluruhan wilayah hilir Sungai Citarum. Sampel disimpan dalam *cool box* yang telah diisi es untuk mempertahankan suhu dingin ( $\pm 4^{\circ}\text{C}$ ) dan disimpan dalam *freezer* ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) setelah sampai di laboratorium.

Peralatan dan bahan yang digunakan selama eksperimen diantaranya medium *Nutrien Broth* (Oxoid CM0001), *incubator shaker* 30°C 150 rpm, spektrofotometer UV-Vis, kuvet kaca quartz, *centrifuge* 15 ml, *microcentrifuge*, *ZymoBiomics Quick DNA Fecal/Soil Miniprep kit* (Cat no. D6010), *Electrophoresis chamber*, UV transluminator, Buffer TAE 1x, gel agarosa 0,8% w/v, *KAPA DNA Loading Dye* (6X), dan *BenchTop DNA Ladder* 1 kb.

### Metode

#### Pengukuran kualitas perairan

Parameter kualitas perairan diukur di lokasi pengambilan sampel air muara pada kondisi cuaca cerah pada bulan Oktober 2019. Parameter fisikokimia yang diukur meliputi suhu perairan, oksigen terlarut (DO), pH, dan salinitas. Analisis nitrogen total (N-total) dilakukan berdasarkan Petunjuk Teknis Departemen Pertanian menggunakan metode Kjeldahl (Departemen Pertanian, 2005), sedangkan analisis TSS berdasarkan Standar Nasional Indonesia tahun 2019 menggunakan metode gravimetri (BSN, 2019). Hasil pengukuran selanjutnya dibandingkan dengan baku mutu air laut untuk biota laut (Kepmen LH No. 51 tahun 2004) dan baku mutu air limbah Kawasan Industri (Permen LH No 3 tahun 2010).

#### Pengayaan sel bakteri

Pengayaan kultur dilakukan untuk meningkatkan sel pada sampel air muara. Sebanyak 3 liter sampel air muara di sentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 30 menit, kemudian 3 ose pelet hasil sentrifugasi diinokulasikan ke dalam medium 50 mL *nutrient broth* (NB, Oxoid CM0001) steril dengan konsentrasi 0.2x (Azmoda et al., 2019). Kultur diinkubasi pada 30°C, agitasi 150 rpm selama 72 jam hingga diperoleh nilai *optical density* (OD) 1,0 ( $1,0 \text{ OD}_{600} = 8 \times 10^8 \text{ CFU/mL}$ ). Sebanyak 50 mL kultur disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 30 menit untuk diambil selnya (pelet). Sel selanjutnya digunakan untuk isolasi DNA genom.

### Isolasi DNA genom total dan kuantifikasi

Pelet kultur hasil sentrifugasi digunakan untuk isolasi DNA genom total menggunakan *ZymoBIOMICS™ Quick DNA Fecal/Soil Miniprep kit (Cat No. D6010)* dengan prosedur menyesuaikan protokol. DNA genom hasil isolasi selanjutnya divisualisasi dengan elektroforesis gel agarosa 0,8% (w/v) sebagai tahap konfirmasi keberhasilan isolasi DNA genom (Gutierrez et al., 2014). Marker yang digunakan yaitu marker *BenchTop DNA Ladder 1kb (G754A)* dan penambah densitas DNA KAPA *DNA Loading Dye 6X (KD6300)*. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 80 V selama 45 menit, selanjutnya diamati dengan *UV-transluminator*. Kuantifikasi konsentrasi DNA diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada absorbansi 260 nm dan 280 nm (Prisentria, 2018):

$$[\text{DNA}]_{\text{ng/ml}} = \text{OD}_{260\text{ nm}} \times 50 \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}} \times \text{faktor pengencer}$$

Sampel DNA hasil isolasi yang telah murni disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  sebelum digunakan analisis lebih lanjut.

### Sekuensing 16S rRNA dan analisis data (Novogene, 2020)

Sebanyak 40  $\mu\text{L}$  sampel DNA genom disimpan dalam *microcentrifuge tube* steril yang di *seal* rapat dan dikirimkan ke Novogene, Singapura untuk dilakukan sekuensing dengan metode *Next Generation Sequencing (NGS)* platform Novaseq Illumina (Illumina Inc. California, USA). Amplifikasi dan sekuensing dilakukan pada *Hypervariable region V3-V4* dengan primer 341F (5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3') dan 806R (5'-GACTACNNGGGTATCTAAT-3') untuk mendeteksi 16S rRNA prokariot (Novogene, 2022).

Hasil sekuensing yang diperoleh berupa data sekuens *paired-end* dalam format *fastq.gz* yang selanjutnya diolah menggunakan FLASH V1.2.7 untuk menggabungkan data sekuens. *Quality control* dilakukan berdasarkan prosedur QIIME V1.7.0 menggunakan algoritma UCHIME untuk mendeteksi sekuens chimera. Analisis sekuens dilakukan dengan *uparse v7.0.1001* untuk menandakan kesamaan OTU. MOTHUR digunakan untuk anotasi spesies *software* sesuai taksonomi, dan analisis filogeni menggunakan MUSCLE V3.8.31 untuk membandingkan urutan sekuens dalam melihat hubungan filogeninya. Analisis keanekaragaman alpha diolah menggunakan QIIME V1.7.0 dan divisualisasi menggunakan R *software* hingga diperoleh data keanekaragaman berupa Chao1, Shanon, Simpson, dan ACE

(Novogene, 2020). Analisis fungsional dilakukan menggunakan website BiosurfDB (<https://www.biosurfdb.org/#/>) dengan mengintegrasikan fasta file dengan database protein yang terlibat dalam degradasi senyawa polutan organik perairan.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Parameter Fisikokimia Perairan

Parameter kualitas perairan diukur untuk mengetahui faktor yang mempengaruhi pertumbuhan dan diversitas bakteri di perairan Muara Gembong yang hasilnya ditunjukkan pada Tabel 1. Hasil pengukuran parameter fisikokimia perairan (pH, DO, suhu, dan salinitas) menunjukkan perairan Muara Gembong masih berada dalam kisaran baku mutu air laut yang baik untuk biota laut. Umumnya, bakteri perairan tumbuh baik pada kondisi perairan dengan pH 6,5–7,5 (Respati, 2017) dan suhu 20 hingga  $40^{\circ}\text{C}$  (Supriyati & Rahayu, 2011). Nilai pH menjadi faktor yang memengaruhi proses degradasi logam berat dan poliaromatik hidrokarbon oleh mikroba dan umumnya mampu mendegradasi dengan baik pada kisaran 7,0–7,5 (Othman et al., 2016). Kadar oksigen terlarut (DO) digunakan mikroorganisme perairan untuk metabolisme guna menghasilkan energi (Jurtschuk, 1996) dan merombak polutan organik (Bara'padang et al., 2019).

Parameter nutrisi (N-total dan TSS) di perairan Muara Gembong telah melebihi baku mutu air laut menurut Kepmen LH No. 51 tahun 2004 (Kementerian Lingkungan Hidup, 2019). Nitrogen total terdiri atas jumlah nitrogen organik, ammonia total, nitrat, dan nitrit di perairan. Tinggi rendahnya nitrogen di perairan dipengaruhi oleh aktivitas biologis biota perairan dan tekanan antropogenik yang masuk dan membawa polutan organik. Umumnya, bakteri perairan memanfaatkan nitrogen pada konsentrasi tertentu untuk fiksasi gas  $\text{N}_2$  terlarut menjadi amonia, amonium, dan nitrat (Putri et al., 2014), kemudian diserap fitoplankton dan biota perairan lainnya sebagai unsur hara dan diubah menjadi protein (Rizal et al., 2017). Tingginya konsentrasi nitrogen total di perairan disebabkan sisa metabolisme biota perairan dan penguraian organisme perairan yang mati. Masukan nitrogen lainnya dapat berasal dari buangan limbah yang masuk ke badan perairan, seperti limbah industri pertanian, kimia, tekstil, kulit, makanan, dan kehutanan (Susana, 2004). Bentuk gabungan kimiawi dari berbagai buangan industri dapat bereaksi membentuk senyawa kimia berbahaya

Tabel 1. Parameter Perairan Muara Gembong dan baku mutu air laut untuk biota laut berdasarkan Kepmen LH No. 51 tahun 2004

Table 1. Water parameters of Muara Gembong sampling site and seawater quality standard for marine biota based on Kepmen LH No. 51 tahun 2004

Parameter Lingkungan/ <i>Environmental Parameters</i>	Satuan/ <i>Unit</i>	Sampel/ <i>Sample</i>		Baku Mutu Air Laut/ <i>Seawater Quality Standard</i>
		A1	A2	
pH	-	7.52	7.57	7 – 8.5
DO	mg/L	6.7	7.1	> 5
Suhu/ <i>Temperature</i>	°C	30	31	28-32
Salinitas/ <i>Salinity</i>	ppt	32	34	≤ 34
N-Total	mg/L	1000	1000	0.3
TSS	mg/L	328.5	380	150

bagi biota perairan dan menurunkan kualitas perairan (Susana, 2014).

Parameter kualitas air lain yang linear dengan N-total adalah meningkatnya kekeruhan perairan yang terlihat dari tingginya nilai TSS di kedua lokasi penelitian. Senyawa polutan dapat menempel pada partikel tersuspensi dan masuk ke badan perairan yang menyebabkan meningkatnya tingkat kekeruhan perairan (Fondriest, 2014). Selain itu, TSS yang tinggi dapat disebabkan adanya laju erosi, aktivitas transpor sedimen melalui aliran sungai, turbulensi sedimen di dasar perairan, dan aktivitas berlabuhnya kapal (Simbolon, 2016).

#### Kuantifikasi DNA Genom Hasil Pengayaan Sel Bakteri

Pengayaan sel bakteri dilakukan dalam identifikasi berbasis NGS untuk mengetahui komposisi komunitas bakteri yang dapat dikulturkan dari suatu ekosistem, sehingga dapat diperoleh jenis bakteri yang berpotensi dalam remediasi perairan tercemar. Hasil isolasi DNA dari pelet kultur menghasilkan konsentrasi DNA genom yang tinggi yakni 234 dan 492,25 ng/μL (Tabel 2). Konsentrasi tersebut telah memenuhi kebutuhan dalam sekuensing DNA genom, yaitu ≥ 20 ng/μL. Konsentrasi DNA dapat dipengaruhi beberapa faktor, diantaranya metode

ekstraksi yang digunakan, rusaknya DNA, dan adanya zat kontaminan seperti fenol atau protein lainnya (Kurniama et al., 2014).

#### Struktur Komunitas Bakteri Perairan

Hasil NGS sampel air yang telah diperkaya teridentifikasi 129.771 bacaan (tag takson 127.993, tag unik 1.824, 49 OTU) dan 128.542 bacaan (tag takson 126.818, tag unik 1.723, 48 OTU) berturut-turut untuk sampel A1 dan A2 (Lampiran 1). Dari kedua sampel teridentifikasi sebanyak 86% atau 42 OTU umum dari total OTU yang teridentifikasi pada kedua lokasi perairan (Lampiran 2). Jumlah OTU umum yang tinggi menunjukkan meratanya mikroba yang teridentifikasi dari sampel perairan hasil pengayaan sel. Sejumlah 7 OTU unik ditemukan pada sampel A1 dan 5 OTU unik pada sampel A2 (Lampiran 2) menunjukkan keanekaragaman tertinggi terdapat pada A1 dari hasil pengayaan, diperkuat pada indeks keanekaragaman (Tabel 3).

Keanekaragaman (indeks *Shannon-Wiener*) pada kedua sampel tergolong dalam kategori kestabilan komunitas bakteri sedang berdasarkan kategori Wilhm dan Doris (1986). Keanekaragaman sangat dipengaruhi oleh nutrisi, yaitu konsentrasi nutrisi tinggi dapat mendukung pertumbuhan spesies yang tumbuh lebih cepat tanpa mengimbangi spesies yang tumbuh lebih

Tabel 2. Konsentrasi dan kemurnian DNA genom total hasil pengayaan bakteri

Table 2. Concentration and purity of total DNA genome of bacteria enrichment

Sampel/ <i>Sample</i>	Abs 260 nm	Abs 280 nm	Konsentrasi/ <i>Concentration (ng/μL)</i>
A1	0.0936	0.0921	234
A2	0.1969	0.1873	492.25

lambat, sehingga berdampak kepada dominansi bakteri (Fuhrman, 2004). Keanekaragaman pada sampel yang diperkaya menunjukkan cenderung lebih rendah jika dibandingkan dengan sampel yang diekstraksi secara langsung. Hal ini disebabkan beberapa spesies bakteri tidak cocok secara metabolik dengan nutrisi pada sampel yang diperkaya, sehingga tidak menggambarkan secara utuh komunitas bakteri lingkungan (Omeroglu et al., 2021). Beberapa bakteri yang cocok secara metabolik dengan nutrisi tersebut menyebabkan tidak seimbang pertumbuhan bakteri dari sampel sehingga menjadi dominan. Hal ini terbukti dengan nilai dominansi (indeks *Simpson*) pada kisaran  $0,75 < D \leq 1$  dengan persentase dominansi bakteri Gammaproteobacteria 99,80% dan 99,82%.

Kekayaan spesies merupakan jumlah spesies yang berbeda dalam suatu komunitas yang dimanfaatkan dalam menganalisis efektivitas dari komunitas biologis pada suatu ekosistem. Kekayaan spesies kedua sampel tergolong rendah, dilihat berdasarkan jumlah OTU yang teridentifikasi. Hal ini disebabkan tidak seluruh bakteri dari lingkungan dapat tumbuh pada sampel yang diperkaya, sehingga hanya spesies bakteri tertentu yang cocok secara metabolik yang dapat tumbuh, dan berdampak pada kekayaan komunitas bakteri (Omeroglu et al., 2021).

Bakteri yang teridentifikasi dari sampel air Muara Gembong yang telah diperkaya terlampir pada Lampiran Tabel 1. Kelimpahan bakteri tertinggi pada kedua sampel didominasi kelas bakteri Gammaproteobacteria (99,81% dan 99,82%) dan diikuti Alphaproteobacteria (0,106% dan 0,04%), *unclassified* Gracilibacteria (0,029% dan 0,05%), Clostridia (0,02% dan 0,01%), Bacilli (0,004% dan 0,02%), Epsilonproteobacteria (0,017% dan 0,02%), dan Flavobacteria (0,002% dan 0,007%) (Lampiran 3). Gammaproteobacteria menunjukkan kelimpahan relatif tinggi dengan indikator warna hijau (Gambar 1). Studi lain menunjukkan sampel perairan yang

diperkaya banyak di dominasi oleh bakteri dari filum Proteobacteria (Kelas Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria), Firmicutes (Kelas Bacilli, Clostridia), Bacteroidetes (Kelas Flavobacteria), Actinobacteria, dan Cyanobacteria (Deshmukh et al., 2011; Glaring et al., 2015; Omeroglu et al., 2021). Komunitas bakteri-bakteri tersebut memiliki peran terhadap proses dalam ekosistem perairan (Ghosh & Bhadury, 2018). Distribusi bakteri tingkat kelas pada penelitian ini ditunjukkan pada diagram heatmap (Gambar 1).

Sampel air muara yang diperkaya memberikan dominansi tinggi pada kelas Gammaproteobacteria, terutama pada tingkat famili Vibrionaceae dengan kelimpahan 89.0371% dan 80.6693%. Pengayaan sampel air Muara Gembong dengan medium NB dapat menyeleksi bakteri *Vibrio*. Studi metagenomik dengan pengayaan sampel air sungai dan menggunakan medium BHI (*Brain Heart Infussion Broth*) menunjukkan kelimpahan tertinggi pada famili Vibrionaceae dan Aeromonadaceae. Pengayaan sel dari sampel dapat meningkatkan jumlah bakteri yang terdapat pada perairan yang terkontaminasi oleh aktivitas manusia di sekitar perairan maupun aktivitas biologis organisme di perairan tersebut (Omeroglu et al., 2021).

Setelah diketahui komposisi bakteri pada sampel yang diperkaya, maka dapat ditentukan golongan bakteri yang berpotensi sebagai agen remediasi perairan Sungai Citarum, khususnya wilayah hilir Muara Gembong. Meskipun studi ini mengidentifikasi komunitas bakteri pada sampel air yang telah diperkaya, secara alaminya Gammaproteobacteria menjadi kelas dominan yang ditemui di sepanjang estuari (Ghosh & Bhadury, 2018; Ibekwe et al., 2016; Jeffries et al., 2016; Nakatsu et al., 2019; Wang et al., 2016;). Gammaproteobacteria dapat terdistribusi secara luas yang didukung oleh faktor keanekaragaman filogenetik dan fenotipik yang sangat besar (Aravindraja et al.,

Tabel 3. Indeks keanekaragaman dan kekayaan spesies bakteri pada Perairan Muara Gembong  
 Table 3. Diversity and species richness indices of bacteria in Muara Gembong

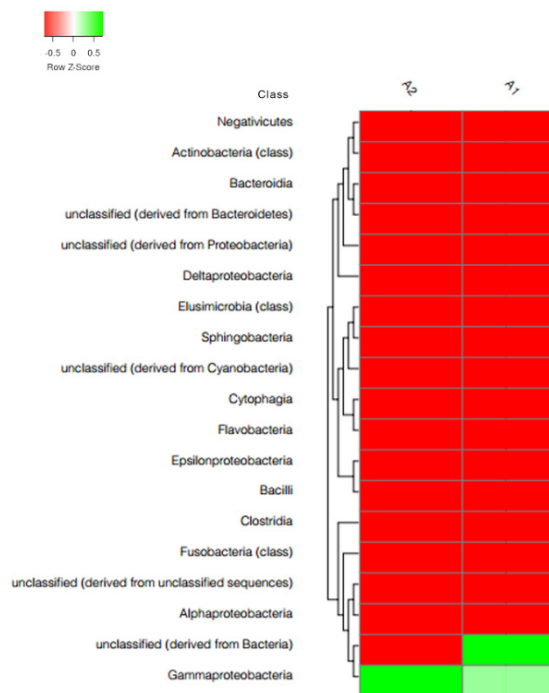
Sampel/ Sample	Spesies Terobservasi/ Observed Species (OTU)	Indeks Kekayaan Spesies/ Indices Species Richness		Indeks Keanekaragaman Bakteri/ Bacteria Diversity Indices	
		Chao1	ACE	Keanekaragaman/ Diversity	Dominansi/ Dominance
A1	49	49	49	2.646	0.796
A2	47	47.333	47.726	2.626	0.781

2013). Genus dengan proporsi tertinggi dari kelas Gammaproteobacteria diantaranya *Vibrio* dan *Pseudoalteromonas* (Gambar 2).

Kelimpahan bakteri *Vibrio* di wilayah estuari berkaitan erat dengan efek antropogenik, terutama pada meningkatnya jumlah nutrisi dan bahan organik (Costa et al., 2010). Bakteri *Vibrio* di perairan laut memiliki peran dalam fiksasi nitrogen (West et al., 1985) dan degradasi polutan organik spesifik (West et al., 1983), sehingga sangat mendukung dalam pemulihan perairan terhadap pencemaran lingkungan. *Vibrio* memiliki enzim nitrogenase (*nifH*), oksidase, dan katalase yang mampu mengubah nitrat menjadi nitrit dan amonia yang aktivitas fermentatifnya tergantung pada kondisi anaerogenik dan salinitas lingkungan (Guerinot et al., 1982). *Pseudoalteromonas* memiliki aktivitas reduksi nitrat dengan aktivitas enzim oksidase and katalase, namun aktivitasnya hanya terbatas hingga nitrit (Xu et al., 2009). *Pseudoalteromonas* mampu menghasilkan senyawa aktif biologis, diantaranya antimikroba, algasida, antijamur, agarolitik, dan antivirus (Holmström & Kjelleberg 1999; Kalinovskaya et al., 2004).

Bakteri lain juga teridentifikasi memiliki peran terhadap komunitas bakteri, serta mampu memulihkan pencemaran lingkungan di perairan. Salah satunya genus *Donghicola*, golongan bakteri dari kelas Alphaproteobacteria, memiliki kemampuan metabolisme seperti oksidasi sulfur, fiksasi karbon autotrofik, fiksasi nitrogen, atau produksi hidrogen dalam berbagai kombinasi (Androga et al., 2012). Sebagian besar spesies dari genus *Donghicola* bersifat fotoautotrof dan fotoheterotrof yang mengandung bakterioklorofil untuk fotosintesis (Kopejtko et al., 2017).

Genus *Clostridia* dari filum Firmicutes juga terlibat dalam dekomposisi anaerobik biomassa *Microcystis* dan mendominasi selama proses berlangsung di perairan (Xin et al., 2011). Selain itu, *Clostridia* memiliki kemampuan fiksasi nitrogen yang memiliki *cluster* sekuens *nif* pada beberapa spesies *Clostridium*, 3 gen (*nifHDK*) yang mengkode polipeptida nitrogenase, 4 gen (*nifE*, *nifN-B*, *nifVw* and *nifVα*) yang mengkode kofaktor *iron-molybdenum*, dan 2 gen lainnya (*nifl-1* dan *nifl-2*) dalam regulasi aktivasi nitrogenase (Chen, 2004).



Gambar 1. Diagram heatmap kelimpahan relatif bakteri tingkat kelas (warna merah menunjukkan kelimpahan bakteri rendah; warna hijau menunjukkan kelimpahan bakteri tinggi)

Figure 1. Heatmap diagram of relative abundances at class level (red color indicates low bacterial abundance; green color indicates high bacterial abundance)

Genus lainnya, *unidentified Gracilibacteria* teridentifikasi pada sampel perairan muara Gembong yang diperkaya. *Unidentified species* yang belum teridentifikasi dengan baik disebabkan kemampuan metabolismenya belum terdeskripsikan dan rendahnya tingkat kemiripan dengan spesies yang terdaftar pada *database* 16S rRNA yang umum digunakan (Parulekar et al., 2017). *Gracilibacteria* tergolong dalam *Candidate Phyla Radiation* (CPR) yang umumnya ditemukan pada kondisi tidak dikulturkan (*unculturable*) dan tidak memiliki aktivitas metabolisme glikolisis, pentosa fosfat, dan jalur *Entner-Doudoroff* (Danczak et al., 2017; Sieber et al., 2019), sehingga sulit diidentifikasi berdasarkan aktivitas metabolismenya. Studi lain tengah mengembangkan status kandidat filum dari *Gracilibacteria* (Sarhan et al., 2019; Sieber et al., 2019) yang tidak memiliki aktivitas metabolisme glikolisis, pentosa fosfat, dan jalur *Entner-Doudoroff* (Sieber et al., 2019). Hal ini memungkinkan *unidentified Gracilibacteria* memperoleh piruvat, asetil-koA, dan oksaloasetat melalui degradasi sitrat, malat, dan asam amino yang diturunkan secara eksternal (Sieber et al., 2019). Namun demikian, aktivitas *Gracilibacteria* sebagai kandidat bioremediasi belum diketahui secara pasti.

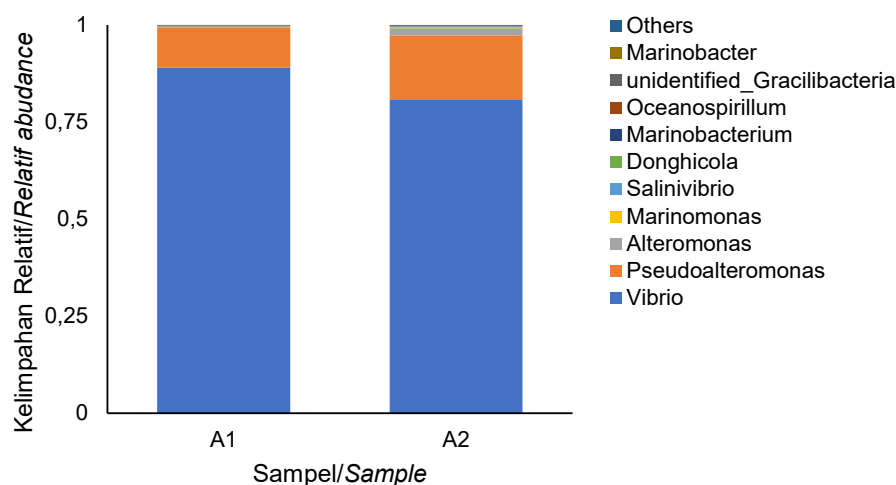
**Analisis Fungsional Bioremediasi pada Komunitas Bakteri Sampel Perairan Diperkaya**

Setelah teridentifikasi bakteri pada sampel air muara yang diperkaya, dilakukan blasting data fasta hasil sekuensing pada *BioSurfDB* untuk mengetahui bakteri, aktivitas metabolisme, dan

enzim/protein yang potensial yang berperan dalam proses degradasi senyawa organik. Hasil *BLAST* file fasta diperoleh kelimpahan relatif dari bakteri teridentifikasi yang terlibat pada metabolisme sel dan proses degradasi senyawa organik perairan (Tabel 4).

Analisis fungsional dilakukan dengan metode komparatif pada protein yang terlibat dalam degradasi senyawa organik. Perangkat lunak *BiosurfDB* menyajikan pangkalan data protein tersebut secara global, informasi protein secara spesifik yang disintesis mikroorganisme dalam sampel perairan, dan jalur metabolisme dalam mendegradasi senyawa organik seperti polisiklik aromatik hidrokarbon, metana, sulfur, maupun senyawa logam berat (Guerra et al., 2018). Hasil pengayaan sel sampel air muara (Tabel 4, Lampiran 4 dan 5) menunjukkan komposisi bakteri pada kedua sampel memiliki kemampuan degradasi terhadap dioxin, asam lemak, naftalen, nitrotoluen, polisiklik aromatik hidrokarbon, dan sulfur. Pada sampel A1, komposisi bakteri memiliki kemampuan tambahan dalam mendegradasi benzoat dan metana.

Jalur metabolisme degradasi lebih banyak ditemukan pada sampel A1 dibandingkan A2, hal ini sejalan dengan jumlah OTU yang teramati pada A1 lebih tinggi (49 OTU) dibandingkan A2 (48 OTU). Dalam degradasi senyawa organik melibatkan peran protein salisilat hidroksilase, *dissimilatory sulfite reductase beta subunit*, *large subunit carbon monoxide dehydrogenase*, *flavin binding monooxygenase*, *carbon monoxide dehydrogenase*, *benzoate dehydrogenase alpha subunit*, dan *rubredoxin NAD+ reductase* (Lampiran 4 dan 5).



Gambar 2. Kelimpahan Relatif Bakteri Muara Gembong Tingkat Genus  
 Figure 2. Relative Abundance of Bacteria in Muara Gembong at Genus Level

Tabel 4. Kelimpahan Relatif Bakteri pada Jalur Degradasi Senyawa Organik

Table 4. Bacteria Relative Abundance of Organic Compound Degradation Pathway

Jalur Degradasi/ Degradation Pathway	Kelimpahan Relatif/ Relative Abundance (%)	
	A1	A2
Degradasi Benzoat/ <i>Benzoate Degradation</i>	4.09	0.00
Degradasi Dioxin/ <i>Dioxin Degradation</i>	14.29	8.33
Degradasi Asam Lemak/ <i>Fatty Acid Degradation</i>	6.12	6.25
Metabolisme Metana/ <i>Methane Degradation</i>	8.16	0.00
Degradasi Naftalen/ <i>Naphthalene Degradation</i>	14.29	12.50
Degradasi Nitrotoluen/ <i>Nitrotoluene Degradation</i>	16.33	4.17
Degradasi Polisiklik Aromatik Hidrokarbon/ <i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation</i>	14.29	8.33
Metabolisme Sulfur/ <i>Sulfur Metabolism</i>	8.16	4.17

Kelimpahan relatif tertinggi diperoleh pada jalur degradasi nitrotoluene (16,33%), polisiklik aromatik hidrokarbon (14,29%), dan dioxin (14,29%). Nitrotoluene tergolong dalam senyawa *xenobiotic* yang tidak disintesis secara alami, sehingga bersifat toksik dan cenderung sulit untuk didegradasi. Senyawa aromatik ini memiliki susunan gugus nitro yang unik, menyebabkan sulitnya terdegradasi oleh enzim yang dimiliki oleh mikroba terkait. Beberapa mikroba memiliki protein tertentu yang dapat mendegradasi senyawa nitrotoluen beserta turunannya, seperti *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas* sp. MR1, *Clostridium* sp. DY2632 dan *Desulfovibrio intestinalis* (Lampiran 4 dan 5) yang teridentifikasi pada kedua sampel perairan yang diperkaya. Teridentifikasinya protein yang terlibat dalam degradasi nitrotoluen pada sampel perairan diperkaya ini disebabkan oleh keberadaan *Clostridium* sp. yang mampu memetabolisme nitrotoluen. *Clostridium* mendegradasi senyawa turunan nitrotoluen melalui triaminotoluen, yang selanjutnya dapat dimetabolisme menjadi *methylphloroglucinol* dan *p-cresol*. Selain itu, *Clostridium* mampu merubah susunan gugus dihidroksilaminodinitrotoluen dan menghasilkan enzim yang berperan dalam *oxygen sensitive* (type II), yaitu *nitroreductases aminofenol* (Huang et al., 2000; Hughes et al., 1998; Ederer et al., 1997; Nunez et al., 2001). Selain *Clostridium*, *Desulfovibrio* memanfaatkan trinitrotoluen sebagai sumber karbon tunggal, trinitrotoluen tereduksi menjadi triaminotoluen melalui eliminasi reduktif gugus amino (Schnell & Schinck, 1991). Mekanisme berbeda dari *Pseudomonas* yang memanfaatkan *hydroxylaminodinitrotoluenes* sebagai metabolit kunci untuk melepaskan nitrogen dari cincin

nitrotoluen, yang selanjutnya direduksi menjadi amonium (Nunez et al., 2001).

Komposisi bakteri perairan yang telah diperkaya teridentifikasi memiliki protein/enzim pendegradasi polisiklik aromatik hidrokarbon. Polisiklik aromatik hidrokarbon tergolong dalam senyawa kontaminan yang tersusun atas senyawa karbon dan hydrogen dengan struktur cincin aromatik yang terbentuk akibat proses pemanasan pada suhu tinggi. Senyawa ini memiliki bioavailabilitas yang tinggi dan sulit untuk didegradasi, sehingga agen biologis yang memiliki jalur metabolisme senyawa PAH dapat dimanfaatkan. Mikroba yang berhasil teridentifikasi pada kedua sampel dengan kemampuan degradasi PAH diantaranya *Streptomyces* sp., *Stenotrophomonas* sp. *Pseudomonas stutzeri*, dan *Marinobacter* sp. *Streptomyces* sp. mendegradasi senyawa PAH naftalen melalui proses hidroksilasi menggunakan enzim dioksigenase, yang selanjutnya didegradasi menjadi asam mukonik. Proses selanjutnya akan berlangsung dalam siklus TCA (Balachandran et al., 2012). Sementara itu, *Pseudomonas stutzeri* mendegradasi PAH melalui proses dioksigenasi dan *meta-cleavage* untuk memperoleh asam monoaromatik, dan dilanjutkan oleh enzim salisilat hidrogenase dan *catechol meta-cleavage* untuk membentuk *2-hydroxypentadienoate* HPD (Nogales et al., 2017). Dalam degradasi PAH, *flavin-binding monooxygenase* (gen *AlmA*) yang terdeteksi pada *Marinobacter* sp. berperan dalam mendegradasi alkana rantai panjang  $\geq 30$  (Wang & Shao, 2012).

Dioxin merupakan senyawa aromatik trisiklik planar yang ditemukan pada perairan dan tanah dari hasil input antropogenik, serta sebagai produk samping dari pembuatan fenol terklorinasi (Field



& Sierra, 2008). Dari kedua sampel, teridentifikasi bakteri *Pseudomonas* dan *Burkholderia* yang memiliki aktivitas dalam mendegradasi senyawa dioxin, khususnya yang terklorinasi rendah. Degradasi dioxin pada kondisi aerobik terjadi melalui proses dioksigenasi menggunakan enzim angular dioksigenase, hidrolase, serta reaksi spontan pada reaksi degradasi. *Burkholderia* mengenali substrat asam klorosiklik yang terakumulasi dari degradasi 4-CDF (dibenzofuran terklorinasi) sebagai substrat untuk pertumbuhan (Field & Sierra, 2008).

Bakteri yang teridentifikasi pada kedua sampel perairan yang diperkaya menunjukkan bakteri *indigenous* memiliki kemampuan mendegradasi polutan organik pada perairan melalui jalur metabolisme yang dimilikinya dengan keberadaan gen-gen pengkode protein dan enzim yang terlibat dalam jalur metabolisme tersebut. Oleh karena itu, bakteri *indigenous* dapat dimanfaatkan sebagai agen bioremediasi polutan organik di Sungai Citarum, terutama wilayah hilir Muara Gembong yang tinggi aktivitas antropogeniknya.

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini, teridentifikasi sebanyak 37 genus, 19 famili, 13 ordo, 7 kelas, dan 4 filum bakteri pada sampel air diperkaya. Keanekaragaman bakteridiperairan Muara Gembong tergolong sedang dengan tingkat dominansi tinggi, yaitu 10 bakteri berdasarkan kelimpahannya yang meliputi kelas Gammaproteobacteria (99,82%), Alphaproteobacteria (0,08%), *unidentified* Gracilibacteria (0,04%), Epsilonproteobacteria (0,02%), Clostridia (0,02%), Bacilli (0,01%), dan Flavobacteria (0,004%). Analisis fungsional menunjukkan bakteri yang teridentifikasi memiliki kemampuan degradasi tertinggi pada nitrotoluene (22,86%), polisiklik aromatik hidrokarbon (20%), dan dioxin (20%) yang melibatkan beberapa protein kunci dalam degradasi senyawa tersebut. Melalui studi ini, dapat dikembangkan lebih lanjut bakteri *indigenous* yang memiliki protein dan enzim yang terlibat dalam degradasi polutan organik sebagai agen bioremediasi di wilayah hilir Muara Gembong.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Riset Fundamental Universitas Padjadjaran sebagai program yang mendukung "Citarum Harum". Penelitian ini juga merupakan proyek peneliti dari Ilmu Kelautan Universitas Padjadjaran.

## DAFTAR PUSTAKA

- Androga, D.D., Özgür, E., Eroglu, I., Yücel, M., & Gündüz, U. (2012). *Photofermentative hydrogen production in outdoor conditions*. Croatia: INTECH Open Access Publisher. <https://www.intechopen.com/chapters/40241>
- Aravindraj, C., Viszwapriya, D., & Karutha, P.S. (2013). Ultradeep 16S rRNA Sequencing Analysis of Geographically Similar but Diverse Unexplored Marine Samples Reveal Varied Bacterial Community Composition. *PLoS ONE*, 8(10), e76724.
- Azmuda, N., Fakruddin, M., Khan, S.I., Birkeland, N.K. (2019). Bacterial Community Profiling of Tropical Freshwaters in Bangladesh. *Front. Public Health*, doi:10.3389/fpubh.2019.00115
- Balachandran, C., Durairandiyar, V., Balakrishna, K., & Ignacimuthu, S. (2012). Petroleum and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation and naphthalene metabolism in *Streptomyces* sp. (ERI-CPDA-1) isolated from oil contaminated soil. *Bioresource Technology*, 112, 83–90. doi:10.1016/j.biortech.2012.02.059
- Bara'padang, B., Fahrudin, A., & Effendi, I. (2019). Analisis Spasial Beban Limbah Budidaya Tambak Terhadap Lingkungan Perairan Pesisir Holtekamp Kota Jayapura, Provinsi Papua. *Jurnal Ilmu Kelautan dan Perikanan Papua*, 2(2), 75-81
- BSN (Badan Standar Nasional). (2019). *Air dan air limbah – Bagian 3: Cara uji padatan tersuspensi total (Total Suspended Solids, TSS) secara gravimetri*. <http://si-spk.bsn.go.id/sni/DetailSNI/12245#> di
- Chen, J.-S. (2004). Nitrogen Fixation in the Clostridia. Nitrogen Fixation: Origins, Applications, and Research Progress, 53–64. doi:10.1007/1-4020-2179-8\_3
- Costa, R.A., Silva, G.C., Peixoto, J.R., Vieira, G.H.F., Vieira, R.H.S.F. (2010). Quantification and distribution of vibrio species in water from an estuary in Ceará-Brazil impacted by shrimp farming. *Brazilian Journal of Oceanography*, 58(3).
- Departemen Pertanian. (2005, 15 Oktober). *Petunjuk Teknis: Analisis Kimia Tanah, Tanaman, Air, Dan Pupuk – N-total*. [https://balittanah.litbang.pertanian.go.id/ind/dokumentasi/juknis/juknis\\_kimia.pdf](https://balittanah.litbang.pertanian.go.id/ind/dokumentasi/juknis/juknis_kimia.pdf)
- Deshmukh, K. B., Pathak, A. P., & Karuppaiyil, M. S. (2011). Bacterial diversity of Lonar soda lake of India. *Indian journal of Microbiology*, 51(1), 107-111.
- Danczak, R. E., Johnston, M. D., Kenah, C., Slattery, M., Wrighton, K. C. & Wilkins, M. J. (2017). Members of the candidate phyla radiation are functionally differentiated by carbon- and nitrogen-cycling capabilities. *Microbiome*, 5(1), 112.
- Ederer, M. M., Lewis, T. A., & Crawford, R. L. (1997). 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) transformation by clostridia isolated from a munition-fed bioreactor: comparison with non-adapted bacteria. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, 18(2-3), 82-8.
- Esteve-Núñez, A., Caballero, A., & Ramos, J. L. (2001). Biological degradation of 2, 4, 6-trinitrotoluene.

- Microbiology and molecular biology reviews*, 65(3), 335-352.
- Fondriest Environmental Learning Center. (2021, 18 Juni). *Turbidity, Total Suspended Solids & Water Clarity*. Internet. <https://www.fondriest.com/environmental-measurements/parameters/water-quality/turbidity-total-suspended-solids-water-clarity/>
- Field, J. A., & Sierra-Alvarez, R. (2008). Microbial degradation of chlorinated dioxins. *Chemosphere*, 71(6), 1005–1018. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.10.039
- Ghosh, A., & Bhadury, P. (2018). *Exploring Biogeographic Patterns of Bacterioplankton Communities Across Global Estuaries*. Wiley Microbiology Open. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30303297/>
- Ghosh, A., Mehta, A., & Khan A. M. 2018. *Metagenomic Analysis and Its Applications*. Reference Module in Life Science. doi:10.1016/B978-0-12-809633-8.20178-7
- Glaring, M. A., Vester, J. K., Lylloff, J. E., Abu Al-Soud, W., Sørensen, S. J., & Stougaard, P. (2015). Microbial diversity in a permanently cold and alkaline environment in Greenland. *PLoS one*, 10(4), e0124863.
- Guerra, A. B., Oliveira, J. S., Silva-Portela, R. C. B., Araújo, W., Carlos, A. C., Vasconcelos, A. T. R., & Agnez-Lima, L. F. (2018). Metagenome enrichment approach used for selection of oil-degrading bacteria consortia for drill cutting residue bioremediation. *Environmental Pollution*, 235, 869–880. doi:10.1016/j.envpol.2018.01.014
- Guerinot, M.L., West, P.A., Lee, J.V., & Colwell, R.R. (1982). *Vibrio diazotrophicus* sp. nov., a Marine Nitrogen-Fixing Bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 350-357.
- Gutiérrez-Lucas, L., Montor-Antonio, J., Cortés-López, N. and del Moral, S. (2014) Strategies for the Extraction, Purification and Amplification of Metagenomic DNA from Soil Growing Sugarcane. *Advances in Biological Chemistry*, 4, 281-289. doi: 10.4236/abc.2014.44034
- Harvell, C. D., Garren, M., Work, T.M., Rosenberg, E., Smith, G.W. & Bourne, D.G. (2010). Microbial disease and coral holobiont. *Trend in Microbiology*, 12, 554-562.
- Hidayatullah, I., Subardjo, P., & Satriadi, A. (2016). Pemetaan genanagan ROB di Pesisir Muara Gembong Kabupaten Bekasi Dengan Menggunakan Sistem Informasi Geografis. *Jurnal Oseanografi*, 5(3), 359 – 367
- Holmström, C., & S. Kjelleberg. (1999). Marine Pseudoalteromonas species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. *FEMS microbiology ecology*, 30(4), 285-293.
- Huang, S., Lindahl, P. A., Wang, C., Bennett, G. N., Rudolph, F. B., & Hughes, J. B. (2000). 2,4,6-trinitrotoluene reduction by carbon monoxide dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4):1474-8.
- Hughes J B, Wang C, Yesland K, Bhadra R, Richardson A, Bennet G, Rudolph F. (1998). Reduction of 2,4,6-trinitrotoluene by *Clostridium acetobutylicum* through hydroxylamino intermediates. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 17(3), 343-348.
- Ibekwe, A.M., Ma, J., & Murinda, S.E. (2016). Bacterial community composition and structure in an Urban River impacted by different pollutant sources. *Journal Science of the Total Environment*. 1, 566-567:1176-1185. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.05.168
- Jeffries, T.C., Schmitz Fontes, M.L., Harrison, D.P., Van-Dongen-Vogels, V., Eyre, B.D., Ralph, P.J., & Seymour, J.R. (2016). Bacterioplankton Dynamics within a Large Anthropogenically Impacted Urban Estuary. *Journal Frontiers in Microbiology*, 6. doi:10.3389/fmicb.2015.01438
- Jurtshuk, P. (1996). *Medical Microbiology. 4th edition: Bacterial Metabolism*. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston
- Kalinovskaya, N.I., Ivanova, E.P., Alexeeva, Y.V., & Gorshkova, N.M. (2004). Low-molecular-weight, biologically active compounds from marine Pseudoalteromonas species. *Current Microbiology* 48, 441–6.
- Kementerian Lingkungan Hidup Republik Indonesia. (2019). *Keputusan Menteri Negara Lingkungan Hidup Nomor 51 Tahun 2004 Tentang Baku Mutu Air Laut*. Jakarta.
- Kopejtká, K., Tomasch, J., Zeng, Y., Tichý, M., Sorokin, D.Y., & Koblížek, M. (2017). Genomic Analysis of the Evolution of Phototrophy among Haloalkaliphilic Rhodobacterales. *Genome Biol Evol*, 9(7). 1950–1962.
- Kurniama, S.S., Naila, M.M., Listyorini, D., & Sri, S.E. (2014). Optimization of DNA Isolation and Purification Technique from Chili Pepper (*Capsicum frutescens*) Using Genomic DNA Mini Kit (Plant) Geneaid. *Semnas. XI Pendidik. Biol. FKIP UNS*, 65–70.
- Nakatsu, C. H., Byappanahalli, M. N., & Nevers, M. B. (2019). Bacterial Community 16S rRNA Gene Sequencing Characterizes Riverine Microbial Impact on Lake Michigan. *Frontiers in Microbiology*, 10.996
- Nogales, J., García, J. L., & Díaz, E. (2017). Degradation of Aromatic Compounds in Pseudomonas: A Systems Biology View. *Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils and Lipids*, 1-49. doi:10.1007/978-3-319-39782-5\_32-1
- Novogene. (2020). *Novogene 16S Analysis Report*. [https://filgen.jp/Product/Bioscience5-seq/Novogene\\_Demo\\_Report\\_16S-V2.pdf](https://filgen.jp/Product/Bioscience5-seq/Novogene_Demo_Report_16S-V2.pdf)
- Novogene. (2022, 21 Juni). *16S/18S/ITS Amplicon Metagenomic Sequencing*. <https://en.novogene.com/services/research-services/metagenome-sequencing/16s-18s-its-amplicon-metagenomic-sequencing/>
- Omeroglu, E. E., Sudagidan, M., Yurt, M. N. Z., Tasbasi, B. B., Acar, E. E., & Ozalp, V. C (2021). Microbial community of soda Lake Van as obtained from direct and enriched water, sediment and fish samples.

- Scientific Reports*, 11(1), 1-13. doi: 10.1038/s41598-021-97980-3
- Othman, N., Abdul-Talib, S., & Tay, C. C. (2016). Optimization of low ring polycyclic aromatic biodegradation. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering Journal*, 136, 012054. doi:10.1088/1757-899x/136/1/012054
- Parulekar, N. N., Kolekar, P., Jenkins, A., Kleiven, S., Utkillen, H., Johansen, A., Sawant, S., Kale, U.K., Kale, M., & Saebo, M. (2017). Characterization of bacterial community associated with phytoplankton bloom in a eutrophic lake in South Norway using 16S rRNA gene amplicon sequence analysis. *PloS one*, 12(3), e0173408 doi:10.1371/journal.pone.0173408
- Praditya, T. (2011). Pengaruh Perubahan Tata Guna Lahan dan Aktivitas Manusia Terhadap Kualitas Air Sub DAS Saluran Tarum Barat. *Skripsi*. Departemen Suberdaya Hutan dan Ekowisata IPB.
- Prisentria, S. (2018). Keanekaragaman Bakteri Pada Terumbu Karang *Acropora* sp. di Pulau Biawak, Indramayu. *Skripsi*. Jatinangor: Prodi Ilmu Kelautan FPIK Unpad
- Putri, F.D.M., Widyastuti, E., & Christiani. (2014). Hubungan Perbandingan Total Nitrogen dan Total Fosfor dengan Kelimpahan Chrysophyta di Perairan Waduk Panglima Besar Soedirman, Banjarnegara. *Journal Scripta Biologica*, 1(1).
- Rastina. (2012). Strategi Pengelolaan Lingkungan Berdasarkan Pemodelan Kualitas Air di Perairan Estuaria Tallo Sulawesi Selatan. *Disertasi*. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Respati, N. Y. (2017). Optimasi Suhu dan pH Media Pertumbuhan Bakteri Pelarut Fosfat dari Isolat Bakteri Termofilik. *Jurnal Prodi Biologi*, 6(7).
- Ridwan, F. (2014). Pemodelan perubahan penutupan/penggunaan Lahan dengan pendekatan artificial neural network dan logistic regression (Studi kasus: DAS Citarum, Jawa Barat). *Skripsi*. Fakultas Pertanian IPB.
- Rizal, A.C., Ihsan, Y.N., Afrianto, E., & Yuliadi, L.P.S. (2017). Pendekatan Status Nutrien Pada Sedimen Untuk Mengukur Struktur Komunitas Makrozoobentos di Wilayah Muara Sungai dan Pesisir Pantai Rancabuaya, Kabupaten Garut. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*, VIII(2)
- Sarhan M.S., Hamza M.A., Yousef H.H., Patz S., Becker M., Elsayew H., Nemer R., Daanaa H.S.A., Mourad E.F., Morsi A.T., Abdelfadeel M.R., Abbas M.T., Fayez M., Rupel S. & Hegazi N.A. (2019). Culturomics of the plant prokaryotic microbiome and the dawn of plant-based culture media – A review. *Journal of Advanced Research*, 19, 15-27.
- Schnell S. & Schinck B. (1991). Anaerobic aniline degradation via reductive deamination of 4-aminobenzoyl-CoA in *Desulfobacterium anilini*. *Archives of Microbiology*, 155, 183–190.
- Sieber, C.M.K., Paul, B.G., Castelle, C.J., Hu, P., Tringe, S.G., Valentine, D.L., & Banfield, J.F. (2019). Unusual Metabolism and Hypervariation in the Genome of a *Gracilibacterium* (BD1-5) from an Oil-Degrading Community. *mBio*, 10(6).
- Simbolon, A.R. (2016). Kandungan Logam Berat Timbal (Pb) di Perairan Cilincing Pesisir DKI Jakarta. *Prosiding Seminar Nasional Pendidikan Biologi dan Biologi*. Yogyakarta: FMIPA UNY
- Supriyati, D. & Rahayu, R.D. (2011). Studi Potensi Bakteri *Labrenzia aggregate* G3 dan Alpha proteobacterium G4. Berk. Penel. *Hayati Edisi Khusus*, 4C (13–18).
- Susana, T. (2004). Sumber polutan nitrogen dalam air laut. *Oseana*, XXIX(3). 25-33,
- Wang, P., Chen, B., Yuan, R., Li, C., & Li, Y. (2016). Characteristics of aquatic bacterial community and the influencing factors in an urban river. *Science of the Total Environment*, 569–570 (2016) 382–389.
- Wang, W., & Shao, Z. (2012). Diversity of flavin-binding monooxygenase genes (*almA*) in marine bacteria capable of degradation long-chain alkanes. *FEMS Microbiology Ecology*, 80(3), 523–533. doi:10.1111/j.1574-6941.2012.01322.x
- West, P.A., Brayton, P.R., Twilley, R.R., Bryant, T.N., & Colwell, R.R. (1985). Numerical taxonomy of nitrogen-fixing “decarboxylase-negative” *Vibrio* species isolated from aquatic environments. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 35198-205.
- West, P.A., Lee, J. V., & Bryant, T. N. (1983). Numerical taxonomy of strains of *Vibrio* species isolated from water and birds in Kent, England. *Journal of Applied Bacteriology*, 55263-282.
- Xing, P., Guo, L., Tian, W., & Wu, Q.L. (2010). Novel clostridium populations involved in the anaerobic degradation of microcystis blooms. *ISME Journal*, 2011, 5. 792–800
- Xu, X.-W., Wu, Y.-H., Wang, C.-S., Gao, X.-H., Wang, X.-G., & Wu, M. (2009). *Pseudoalteromonas lipolytica* sp. nov., isolated from the Yangtze River estuary. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 60(9), 2176–2181.