

EKSPLORASI, SELEKSI DAN IDENTIFIKASI KANDIDAT BAKTERI SELULOLITIK ASAL EKOSISTEM MANGROVE SUNGAILIAT, PULAU BANGKA

EXPLORATION, SELECTION AND IDENTIFICATION THE CANDIDATE OF CELLULOLYTIC BACTERIA FROM MANGROVE ECOSYSTEM IN SUNGAILIAT, BANGKA ISLAND

Liza Janatul Khulud¹, Dwi Febrianti², Eva Prasetyono³, Robin³, Ardiansyah Kurniawan^{3,*}

¹Program Studi Magister Bioteknologi, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung

²Pusat Penelitian Limnologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Cibinong

³Jurusan Akuakultur, Fakultas Pertanian Perikanan dan Biologi, Universitas Bangka Belitung

* email korespondensi: ardian_turen@yahoo.co.id

Abstrak

Mangrove memiliki potensi sebagai sumber bakteri pendegradasi selulosa. Pulau Bangka, yang kaya mineral timah, belum dikaji potensi bakteri selulolitiknya. Tujuan penelitian ini untuk mendapatkan kandidat bakteri selulolitik melalui seleksi isolat dari serasah daun lapuk, kayu lapuk, dan lumpur mangrove, serta mengevaluasi patogenisitas kandidat bakteri selulolitik melalui uji patogenisitas secara *in vivo*. Penelitian terlaksana pada bulan Januari sampai dengan April 2018. Materi uji yang digunakan pada penelitian ini adalah kandidat bakteri selulolitik yang diisolasi dari lumpur, serasah daun dan kayu lapuk dari tumbuhan mangrove dan ikan nila (*Oreochromis niloticus*). Metode penelitian yang digunakan yaitu metode deskriptif dan eksperimental. Metode deskriptif digunakan pada pengujian bakteri secara *in vitro*, pegamatan gejala klinis ikan dan kondisi organ dalam ikan setelah diberi perlakuan. Metode eksperimental digunakan pada uji patogenisitas untuk pengamatan parameter kelangsungan hidup. Perlakuan yang diberikan pada ikan uji meliputi injeksi dengan kandidat bakteri selulolitik, injeksi dengan NaCl dan tanpa injeksi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolasi dan seleksi kandidat bakteri selulolitik didapatkan sebanyak empat belas isolat. Isolat kandidat bakteri selulolitik yang memiliki aktivitas selulolitik terbaik yaitu isolat bakteri yang berasal dari serasah daun mangrove dengan kode isolat SLS5. Berdasarkan uji biokimia, isolat bakteri SLS5 tersebut teridentifikasi sebagai *Bacillus sp.* Pengujian patogenisitas bakteri SLS5 membuktikan bahwa bakteri ini bersifat non-patogen (tidak menyebabkan sakit dan kematian) pada ikan Nila.

Kata kunci: Pendegradasi selulosa, Patogenisitas, *Bacillus sp.*, Ikan Nila.

Abstract

Mangroves have potential as a source of cellulose-degrading bacteria. Bangka Island, which is rich in tin minerals, has not yet studied the potential for cellulolytic bacteria. This study aims to obtain cellulolytic bacterial candidates by selecting isolates from mud, leaf litter, and mangrove rotting wood and evaluating the pathogenicity properties of cellulolytic bacteria candidates through *in vivo* pathogenicity tests. The research was carried out from January to April 2018. The test materials used in this study were candidate cellulolytic bacteria isolated from mud, leaf litter, and weathered wood from mangrove plants and tilapia (*Oreochromis niloticus*). The research method used is descriptive and experimental methods. The descriptive method was used in *in vitro* bacterial testing, observing the clinical symptoms of fish and the condition of the internal organs of the fish after being treated. The experimental method was used in the pathogenicity test to observe the survival parameters. The treatments given to the test fish included injection with cellulolytic bacterial candidates, injection with NaCl, and without injection. The results showed that candidate cellulolytic bacteria's isolation and selection were obtained as many as fourteen isolates. Candidate isolates for cellulolytic bacteria with the best cellulolytic activity are bacterial isolates derived from mangrove leaf litter with isolate code SLS5. Based on biochemical tests, the SLS5 bacterial isolate was identified as *Bacillus sp.* The pathogenicity test of SLS5 bacteria proves that these bacteria are non-pathogenic (do not cause illness and death) in Tilapia.

Keywords: Cellulose degradation, pathogenicity, *Bacillus sp.*, Tilapia.

Pendahuluan

Harga pakan ikan menjadi kendala dalam perkembangan akuakultur. Pakan memberikan kontribusi terbesar pada biaya produksi budidaya ikan hingga 60% [1]. Penekanan biaya pakan dapat menurunkan biaya produksi yang berkorelasi

terhadap meningkatnya kesejahteraan pelaku usaha akuakultur. Salah satu cara yang ditempuh dengan mensubstitusi bahan alternatif yang mudah diperoleh, tidak bersaing dengan kebutuhan manusia, memiliki nilai ekonomis rendah, dan tersedia sepanjang waktu. Limbah organik dari produk hasil perkebunan dan pertanian dapat

dimanfaatkan sebagai sumber bahan baku alternatif untuk pakan ikan. Indonesia memiliki limbah organik yang melimpah yang memiliki energi dan nitrogen tinggi dari sisa produksi kedelai, kelapa sawit, kakao, padi, dan jagung [2]. Kendala pemanfaatan bahan baku pakan ikan adalah tingginya kandungan selulosa yang menghambat pertumbuhan ikan karena minimnya nutrisi yang dapat dimanfaatkan. Ikan memiliki keterbatasan dalam memanfaatkan serat karena keterbatasan enzim selulase dalam saluran pencernaannya. Serat menyebabkan pakan hanya transit dalam waktu singkat dalam saluran pencernaan sehingga absorpsi pakan tersebut dalam usus menjadi berkurang [3].

Bakteri selulolitik mampu menghasilkan enzim selulase yang berfungsi merombak selulosa menjadi gula sederhana. Bakteri ini berpeluang dimanfaatkan sebagai predigest untuk menghidrolisis selulosa dalam bahan pakan nabati sebagaimana telah dilakukan pada tepung daun Lamtoro dan Onggok [4,5], Bakteri pendegradasi selulosa banyak diisolasi dan dikarakterisasi dari berbagai sumber seperti tanah busuk, kompos, dan rumen ruminansia [6,7,8]. Potensi bakteri selulolitik alam terdapat di ekosistem mangrove [9]. Serasah daun, kayu lapuk, dan lumpur mangrove kaya bahan organik dari peran bakteri selulolitik [10, 11]. Proses dekomposisi serasah mangrove mencakup penguraian komponen selulosa oleh mikroorganisme, khususnya bakteri selulolitik. Hutan mangrove merupakan tempat berkembangnya komunitas bakteri [12].

Selulosa yang terdapat dalam bahan organik mangrove dapat menjadi energi bagi organisme lain dengan adanya peran bakteri selulolitik. Kemampuan hidrolisis selulosa kompleks menjadi oligosakarida sederhana oleh bakteri selulolitik yang menggunakan enzim selulasenya untuk menghasilkan glukosa [2]. Pulau Bangka yang lebih dikenal dengan kekayaan mineral timah, memiliki mangrove di sekeliling pulauanya. Kajian bakteri selulolitik dan potensinya sebagai kandidat pendegradasi selulosa alami perlu dilakukan di mangrove-mangrove pulau Bangka untuk melengkapi kajian sejenis di Indonesia. Kandidat bakteri selulolitik dari serasah daun, kayu lapuk dan lumpur mangrove dapat menjadi landasan pemanfaatan bakteri selulolitik mendegradasi selulosa untuk kebutuhan pakan ikan.

Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini meliputi dua metode, yaitu metode deskriptif dan eksperimental. Metode deskriptif digunakan pada

penelitian tahap pertama yaitu pengujian secara in vitro. Pada penelitian tahap dua yang menguji patogenisitas isolat bakteri menggunakan metode deskriptif untuk mengamati gejala klinis dan organ dalam ikan, serta metode eksperimental untuk pengamatan parameter kelangsungan hidup. Uji in vitro meliputi pengambilan sampel, isolasi bakteri dari serasah daun lapuk, kayu lapuk dan tanah lumpur mangrove, karakterisasi morfologi isolat bakteri, uji aktivitas selulolitik dan identifikasi secara biokimia. Sampel serasah daun, kayu lapuk, dan lumpur mangrove diambil dari mangrove di Kecamatan Sungailiat (Gambar 1).

Bakteri dalam sampel dari mangrove ditumbuhkan dalam media selektif dengan *Carboxymethyl Cellulosa* (CMC) 1%. Koloni yang tumbuh diisolasi dan diamati secara makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan makroskopis meliputi morfologi koloni seperti bentuk, tepi, elevasi, warna koloni, dan uji akritisitas enzim selulase. Pengujian daya enzim selulase memanfaatkan CMC 1% yang difortifikasikan dalam media agar. Satu goresan isolat diinkubasikan dalam media kultur selama 3x24 jam. *Congo red* digunakan untuk memvisualisasikan daya degradasi enzim terhadap selulosa menggunakan. Zona bening di sekitar koloni akan mudah terlihat saat ditambahkan *congo red*. Indeks aktifitas selulase dihitung menggunakan persamaan (1) berikut.

$$IS = \frac{X1-X2}{X2} \quad (1)$$

IS adalah Indeks aktivitas selulase, X1 merupakan nilai rerata diameter zona bening (mm) dan X2 adalah rerata diameter koloni (mm) [13].

Pengamatan secara mikroskopis dilakukan dengan mengamati morfologi dan warna sel, serta pengamatan terhadap hasil uji pewarnaan Gram, uji katalase, uji oksidase, uji motilitas, dan uji oksidatif/fermentatif (O/F). Parameter lain yang juga diamati pada uji in vitro pada penelitian ini adalah indeks selulolitik berdasarkan pengamatan zona bening yang terbentuk pada media uji. Kandidat bakteri selulolitik yang terpilih dari uji in vitro kemudian dilanjutkan pada pengujian patogenisitas (*in vivo*). Uji ini bertujuan agar dapat diketahui respon ikan terhadap isolat. Satu goresan isolat kandidat bakteri selulolitik dikultur dalam 10 mL media cair *Nutrient Broth* (NB). Inkubasi media kultur selama 24 jam dalam suhu 25°C. Proses mutasi spontan melalui penumbuhan bakteri hasil kultur pada media NA yang ditambahkan rifampisin 50 µg/mL (NA+Rf). Mutasi spontan bermanfaat agar jenis bakteri yang berperan dan bertahan di tubuh ikan merupakan bakteri yang diujikan [14].

Inokulum bakteri yang telah dimutankan sebanyak 0,1 ml dalam kepadatan 10^8 CFU/ml disuntikkan ke ikan Nila. Uji patogenisitas dilakukan menggunakan metode eksperimental berupa Rancangan Acak Lengkap (RAL) tunggal 3 ulangan dengan tiga perlakuan yang diberikan pada ikan uji, yaitu injeksi dengan bakteri kandidat selulolitik, injeksi dengan NaCl dan tanpa injeksi. Ikan diamati gejala klinis, tingkah laku dan tingkat kematiannya selama 14 hari. Pada akhir pemeliharaan dilakukan pembedahan untuk mengamati tampilan organ dalam yaitu hati, ginjal, dan empedu [15]. Kelangsungan hidup ikan diamati sebagai variabel kuantitatif dengan persamaan ikan yang bertahan hidup dibandingkan dengan jumlah ikan awal [16].

$$SR (\%) = \frac{No - Nt}{No} \times 100 \quad (2)$$

No merupakan jumlah ikan diawal penelitian dan Nt sebagai jumlah ikan yang bertahan hidup diakhir penelitian.

Analisis data dilakukan dengan menggunakan Uji ANOVA RAL tunggal untuk mengevaluasi penelitian apakah pengaruh perlakuan bakteri selulolitik kandidat probiotik berbeda nyata atau tidak terhadap SR pada uji patogenisitas dan uji in vitro. Data hasil uji ditabulasi menggunakan program Microsoft Excel 2010 dan ditampilkan menggunakan tabel. Data hasil isolasi, identifikasi dan pengamatan pada uji in vitro kandidat bakteri selulolitik dianalisis secara deskriptif dan disajikan dalam bentuk tabel.



Gambar 1. Lokasi sampling serasah daun, kayu lapuk, dan lumpur mangrove di Sungailiat, Bangka

Hasil dan Diskusi

Sampel serasah daun (SLS) dan kayu lapuk (SLK) mangrove menghasilkan masing-masing 5 isolat bakteri dan sampel lumpur (SLL) mendapatkan 4 isolat bakteri. Isolat ini merupakan bakteri yang mampu memanfaatkan CMC 1% dalam media tumbuh dan diprediksi memiliki kemampuan mendegradasi selulosa. Karakter morfologi koloni bakteri pada warna, bentuk, tepian, elevasi dan tampilannya beragam (Tabel 1). Sebagian besar isolat memiliki karakteristik berwarna krem, berbentuk bulat, tepian bergerigi, elevasi sedikit menonjol dan tampilan koloni tampak kabur. Pada uji pewarnaan Gram, hanya ada dua isolat yang merupakan bakteri Gram positif yaitu SLK 3 dan SLS5 (Tabel 2).

Isolat lainnya merupakan gram negatif dengan ciri bentuk bulat dan berwarna merah muda. Pada pengujian daya degradasi selulosa, terdapat empat isolat yang memiliki kemampuan mendegradasi selulosa yaitu SLK3, SLL2, SLL3, dan SLS 5 (Tabel 3). Keberadaan enzim ekstraseluler berupa selulase merupakan salah satu kriteria yang harus dimiliki kandidat bakteri selulolitik yang ditujukan untuk mendukung proses degradasi selulosa pada pakan yang sulit dicerna oleh ikan.

Tabel 1. Karakter morfologi koloni isolat bakteri yang diisolasi dari mangrove Sungailiat.

Kode Isolat	Karakter morfologi koloni isolat bakteri					
	Warna	Bentuk	Ukuran	Tepian	Elevasi	Tampilan
SLK1	Krem	Bulat berawan	Titik	Bergerigi	Menonjol sedikit	Kabur, berawan
SLK2	Krem	Bulat	Titik	Rata	Datar	Kabur
SLK3	Krem	Bulat	Besar	Bergerigi	Menonjol sedikit	Kabur
SLK4	Krem	Bulat	Sedang	Bergerigi	Menonjol sedikit	Kabur
SLK5	Putih transparan	Bulat	Sedang	Rata	Menonjol sedikit	Sedikit transparan
SLL1	Putih pekat	Bulat	Titik	Rata	Datar	Kabur
SLL2	Krem	Bulat	Besar	Bergerigi	Menonjol sedikit	Kabur
SLL3	Krem	Bulat berawan	Kecil	Bergerigi	Menonjol sedikit	Kabur
SLL4	Krem	Bulat	Kecil	Bergerigi	Menonjol sedikit	Putih pekat
SLS1	Krem	Bulat berawan	Kecil	Bergerigi	Menonjol sedikit	Tepian transparan
SLS2	Krem	Bulat	Besar	Bergerigi	Menonjol sedikit	Kabur
SLS3	Krem	Bulat	Titik	Rata	Datar	Kabur
SLS4	Putih bening	Tidak beraturan	Besar	Tidak beraturan	Datar	Transparan
SLS5	Krem	Bulat	Kecil	Rata	Menonjol sedikit	Sedikit transparan

Keterangan: SLK = Isolat dari kayu lapuk ; SLL = Isolat dari lumpur mangrove; SLS = Isolat dari serasah daun mangrove.

Tabel 2. Hasil pewarnaan Gram

Kode isolat	Bentuk sel	Warna	Jenis Gram
SLK1	Bulat	Merah muda	Negatif
SLK2	Bulat	Merah muda	Negatif
SLK3	Batang	Ungu	Positif
SLK4	Bulat	Merah muda	Negatif
SLK5	Bulat	Merah	Negatif
SLL1	Bulat	Merah muda	Negatif
SLL2	Bulat	Merah muda	Negatif
SLL3	Bulat	Merah	Negatif
SLL4	Bulat	Merah	Negatif
SLS1	Bulat	Merah muda	Negatif
SLS2	Bulat	Merah muda	Negatif
SLS3	Bulat	Merah muda	Negatif
SLS4	Bulat	Merah muda	Negatif
SLS5	Batang	Ungu	Positif

Tabel 3. Hasil pengujian aktivitas selulolitik

Kode Isolat	Aktivitas selulolitik	Indeks selulolitik (IS)	Klasifikasi nilai IS
SLK1	-	-	-
SLK2	-	-	-
SLK3	+	-	-
SLK4	-	-	-
SLK5	-	-	-
SLL1	-	-	-
SLL2	+	-	-
SLL3	+	-	-
SLL4	-	-	-
SLS1	-	-	-
SLS2	-	-	-
SLS3	-	-	-
SLS4	-	-	-
SLS5	+	0,63	Rendah

Keterangan: (+) ada dan (-) tidak ada aktivitas selulolitik

Sebagian besar isolat menunjukkan aktifitas selulolitik negatif dengan tidak munculnya zona bening disekitar koloni. Terbentuknya zona bening pada uji aktivitas selulolitik menunjukkan bahwa keempat isolat tersebut mampu mendegradasi selulosa dari CMC [15]. Degradasi selulosa akibat aktifitas enzim selulase memunculkan zona bening di sekitar koloni bakteri [10]. Indeks terbesar dalam mendegradasi selulosanya adalah pada isolat SLS5 dengan nilai sebesar 0,63. Nilai tersebut dalam kategori Indeks Selulolitik rendah. Daya degradasi selulosa oleh bakteri dikategorikan rendah jika nilai indeks selulolitiknya ≤ 1 [17]. Berdasarkan hasil karakterisasi morfologi koloni, pewarnaan gram dan aktifitas selulolitiknya, isolat SLS5 memiliki kemungkinan dijadikan kandidat bakteri selulolitik dibandingkan isolat lainnya. Bakteri patogen di alam umumnya merupakan bakteri Gram negatif [18]. Meski demikian bakteri gram positif juga tidak menjamin tidak bersifat patogen. Terdapat beberapa spesies bakteri patogen yang memiliki sifat Gram positif [19].

Pemastian patogenitas isolat bakteri dilakukan dengan mengujikannya pada hewan uji. Isolat SLS 5 disuntikkan ke hewan uji yaitu ikan Nila dan dibandingkan dengan ikan tanpa terdedar isolat bakteri SLS5. *Survival rate* menunjukkan tidak adanya perbedaan antara ikan yang diinjeksi isolat bakteri SLS5 dengan ikan tanpa injeksi dan diinjeksi NaCl. Notasi yang sama menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata (Tabel 4). Jumlah kematian ikan yang diinjeksi adalah sama,

sedangkan ikan tanpa perlakuan mengalami kematian yang lebih banyak. Hal ini menunjukkan kematian ikan bukan disebabkan oleh penyakit yang diakibatkan oleh isolat bakteri SLS5.

Tabel 4. Kelangsungan hidup atau *survival rate* ikan nila selama 14 hari pemeliharaan

Perlakuan	SR
Diinjeksi dengan isolat SLS 5	66,67% \pm 0
Diinjeksi dengan NaCl	66,67% \pm 0
Tidak diinjeksi	44,33% \pm 0

Nafsu makan ikan setelah penyuntikan mengalami penurunan, namun tidak terjadi perbedaan antara ikan yang diinjeksi isolat bakteri dengan injeksi dengan NaCl 0.9%. Kedua perlakuan menunjukkan nafsu makan normal pada hari ke empat setelah penyuntikan. Perbedaan terjadi pada tampilan visual empedu dan hati. Empedu ikan yang diinjeksi isolat bakteri tampak lebih gelap warnanya dibandingkan perlakuan lainnya, sedangkan warna hati lebih pucat. Warna ginjal memiliki kesamaan dengan ikan pada perlakuan NaCl 0.9% (Tabel 5). Pada organ luar ikan seperti mata, sirip, sisik dan kulit' tidak ditemukan perubahan makroskopis selama pengamatan pasca injeksi baik perlakuan isolat maupun NaCl 0.9%. Hal berbeda jika yang disuntikkan adalah bakteri patogen, umumnya akan muncul tanda luka pada tubuh ikan [20].

Tabel 5. Gejala klinis pasca injeksi dan kondisi organ dalam ikan pada akhir waktu pemeliharaan

Jenis perlakuan	Kondisi organ dalam hari ke-14			Gejala klinis
	Empedu	Hati	Ginjal	
Diinjeksi dengan isolat SLS5	Hijau pekat	Coklat pucat	Merah	Nafsu makan rendah hingga hari ke-4 setelah perlakuan
Diinjeksi dengan NaCl 0.9%	Hijau	Coklat	Merah	
Tidak diinjeksi	Hijau bening	Coklat	Merah pekat	

Tabel 6. Hasil uji biokimia isolat SLS5

Jenis pengujian	Hasil uji	Jenis pengujian	Hasil uji
Pewarnaan gram	+	LIA	+
Motilitas	-	Citrat	-
Katalase	+	MR	-
Oksidase	+	VP	-
TSIA	K/A	Gelatin	+
Glukosa	+	Urease	-
OF	F	Eskulin	-
Ornithin	-	H ₂ S	-

Keterangan: (+) = hasil uji positif, (-) = hasil uji negatif, K/A = Kalis/asam, OF = Oksidatif fermentatif, F= Fermentatif

Uji biokimia pada isolat SLS5 memprediksi bahwa bakteri tersebut memiliki kemiripan karakter dengan *Bacillus* sp. Isolat menunjukkan nilai positif pada karakter pewarnaan Gram, katalase, oksidase, glukosa, LIA, dan gelatin (Tabel 6). Genus *Bacillus* memiliki ciri-ciri sebagai sel dengan bentuk batang lurus, sering tersusun berpasangan atau berantai. Sel membentuk endospora oval atau bulat. Kebanyakan sel motil, katalase biasanya dibentuk oleh hampir semua spesies, dan hidup secara aerob atau anaerob fakultatif dan bersifat kemoorganotrofik [21]. Hasil uji patogenisitas dan uji biokimia menunjukkan bahwa bakteri SLS5 (*Bacillus* sp) tidak bersifat patogen pada ikan Nila.

Bakteri AQS *Bacillus* sp tidak bersifat patogen pada ikan lele, walaupun diberikan pada dosis yang tinggi (10^{11} sel/ml) (Novita 2015). *Lactobacillus acidophilus* dan *Bacillus subtilis* yang diinjeksikan pada ikan Nila tidak mengakibatkan kematian pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*) hingga 2 minggu pemeliharaan [22]. Kualitas air pemeliharaan pada uji patogenisitas berada pada kisaran yang layak untuk pemeliharaan ikan nila. Suhu air pemeliharaan ikan selama penelitian berkisar antara 24°-29°C, derajat keasaman air (pH) antara 6,5–8, dan oksigen terlarut (*Dissolve Oxygen*) pada air selama pemeliharaan berkisar antara 3,3-4,2 mg/L. Kualitas air dalam kisaran optimum dalam akuakultur tidak memberikan pengaruh pada perilaku ikan. Perubahan nafsu makan setelah injeksi dapat dipicu oleh stressor yang disebabkan proses penyuntikan [23].

Simpulan

Hasil isolasi dan seleksi bakteri kandidat selulolitik asal kayu lapuk, lumpur dan serasah daun mangrove Sungailiat mendapatkan empat belas isolat. Isolat kandidat bakteri selulolitik yang memiliki aktivitas selulolitik terbaik dengan indeks selulolitik sebesar 0,63 yaitu isolat bakteri yang berasal dari serasah daun mangrove dengan kode isolat SLS5. Hasil uji biokimia menunjukkan isolat bakteri SLS5 sebagai *Bacillus* sp. SLS5 tidak bersifat patogen pada ikan Nila.

Ucapan Terimakasih

Penelitian ini didanai Ditjen Penguatan Riset dan Pengembangan Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi atas pendanaannya melalui Program Penelitian Kerjasama Perguruan Tinggi (PKPT) tahun 2017-2018 antara Universitas Bangka Belitung dan Universitas Brawijaya.

Daftar Pustaka

- [1] Andriani, Y., Sastrawibawa, S., Safitri, R., & Abun, A. (2012). Isolasi dan identifikasi mikroba selulolitik sebagai biodegradator serat kasar dalam bahan pakan dari limbah pertanian. *Indonesian Journal of Applied Sciences*, 2(3), 100-105.
- [2] Kurniawan, A., Sari, S. P., Asriani, E., Prihanto, A. A., Kurniawan, A., & Sambah A. B. (2019). *Bakteri selulolitik mangrove*. UBB Press.
- [3] Fitriyanti, I. (2010). Peningkatan kualitas tepung daun lamtoro dengan penambahan ekstrak cairan rumen domba (*Ovis aries*) untuk bahan pakan ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). *Disertasi*. Bogor: Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- [4] Bairagi, A., Sarkar Ghosh, K., Sen, S. K., & Ray, A. K. (2004). Evaluation of the nutritive value of *Leucaena leucocephala* leaf meal, inoculated with fish intestinal bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus circulans* in formulated diets for rohu, *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings. *Aquaculture Research*, 35(5), 436-446.
- [5] Wizna, H. A., Rizal, Y., Dharma, A., & Kompang, I. P. (2009). Improving the quality of tapioca by-products (onggok) as poultry feed through fermentation by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8(10), 1636-1640.
- [6] Murtiyansih, H., & Hazmi, M. (2017). Isolasi dan uji aktivitas enzim selulase pada bakteri selulolitik asal tanah sampah. *Agritrop: Jurnal Ilmu-Ilmu Pertanian (Journal of Agricultural Science)*, 15(2), 17-23.
- [7] Arifin, Z., Gunam, I. B. W., Antara, N. S., & Setiyo, Y. (2019). Isolasi bakteri selulolitik pendegradasi selulosa dari kompos. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*, 7(1), 30-37.
- [8] Yogyakarta, S. A., Rukmi, M. I., & Raharjo, B. (2016). Ekplorasi bakteri selulolitik dari cairan rumen sapi Peranakan Fries Holland (PFH) dan Limousine Peranakan Ongole (Limpo). *Jurnal Akademika Biologi*, 5(4), 70-80.
- [9] Kurniawan, A., Febrianti, D., Sari, S. P., Prihanto, A. A., Asriani, E., Kurniawan, A., & Sambah, A. B. (2018). Isolasi dan identifikasi bakteri pendegradasi selulosa asal ekosistem mangrove Tukak Sadai,

- Bangka Selatan. *Jurnal Perikanan Pantura (JPP)*, 1(2), 9-16.
- [10] Kurniawan, A., Sari, S. P., Asriani, E., Kurniawan, A., Sambah, A. B., Triswiyana, I., & Prihanto, A. A. (2019). Kapasitas hidrolisis bakteri pendegradasi selulosa dari ekosistem mangrove. *Journal of Tropical Marine Science*, 2(2), 76-82.
- [11] Kurniawan, A. (2018). Bakteri selulolitik pada kayu lapuk di Mangrove Sungailiat, Bangka dan Tukak Sadai, Bangka Selatan. In *Prosiding Seminar Nasional Lingkungan Lahan Basah* (Vol. 3, No. 1).
- [12] Kurniawan, A., Prihanto, A. A., Puspitasari, S., Kurniawan, A., Asriani, E., & Sambah, A. B. (2018). Cellulolytic bacteria mangrove leaf litter in Bangka Island. *Samakia: Jurnal Ilmu Perikanan*, 9(1), 6-11.
- [13] Lim, G., Tan, T. K., & Rahim, N. A. (1987). Variations in amylase and protease activities among Rhizopus isolates. *MIRCEN Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 3(3), 319-322.
- [14] Widanarni, W., Sukenda, S., & Setiawati, M. (2008). Bakteri probiotik dalam budidaya udang: Seleksi, mekanisme aksi, karakterisasi, dan aplikasinya sebagai agen biokontrol. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 13(2), 80-89.
- [15] Dewi, Y., Robin, R., Prasetyono, E., & Kurniawan, A. (2020). Aktifitas selulolitik dan Patogenisitas Bacillus cereus_TSS4 dari serasah daun mangrove. *DEPIK Jurnal Ilmu-Ilmu Perairan, Pesisir dan Perikanan*, 9(1), 8-17.
- [16] Muchlisin, Z. A., Afrido, F., Murda, T., Fadli, N., Muhammadar, A. A., Jalil, Z., & Yulvizar, C. (2016). The effectiveness of experimental diet with varying levels of papain on the growth performance, survival rate and feed utilization of keureling fish (Tor tambra). *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 8(2), 172-177.
- [17] Choi, Y. W., Hodgkiss, I. J., & Hyde, K. D. (2005). Enzyme production by endophytes of Brucea javanica. *Journal of Agricultural Technology*, 1(2), 55-66.
- [18] Rahmaningsih, S., Wilis, S., & Mulyana, A. (2017). Bakteri patogen dari perairan pantai dan kawasan tambak di Kecamatan Jenu Kabupaten Tuban. *Ekologia: Jurnal Ilmiah Ilmu Dasar dan Lingkungan Hidup*, 12(1), 1-5.
- [19] Huda, M. (2017). Pengaruh madu terhadap pertumbuhan bakteri gram positif (staphylococcus aureus) dan bakteri gram negatif (escherichia coli). *Jurnal Analisis Kesehatan*, 2(2), 250-259.
- [20] Kurniawan, A., & Jumita, D. N. (2019). Fortified feed of avocado (Persea americana) leaf extract for septicemia motile aeromonad disease prevention in catfish. *Scripta Biologica*.
- [21] Cowan, S. T. (2004). *Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria*. Cambridge university press.
- [22] Aly, S. M., Abd-El-Rahman, A. M., John, G., & Mohamed, M. F. (2008). Characterization of some bacteria isolated from Oreochromis niloticus and their potential use as probiotics. *Aquaculture*, 277(1-2), 1-6.
- [23] Kurniawan, A., Azhari, M., & Prasetyono, E. (2019). Domestication of Osteochilus spilurus: survival and growth in recirculated water. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 230, No. 1, p. 012116). IOP Publishing.