

## **Analisis keragaman genetik bakteri dalam bioflok dengan teknik ARDRA gen 16S-rRNA**

### **Analysis of bacterial genetic diversity in biofloc by using ARDRA 16S-rRNA gene**

**Widanarni\*, Dewi Nurhayati, Dinamella Wahjuningrum**

Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor  
Kampus IPB Dramaga Bogor, Jawa Barat 16680

\*Surel: widanarni@yahoo.com

#### **ABSTRACT**

This study aimed to analyze the genetic diversity of bacteria associated in bioflocs using 16S-rRNA polymerase chain reaction (PCR) with ARDRA technique. A total of 38 dominant bacterial isolates was obtained from bioflocs samples and of these isolates, 16S-rRNA gene was then isolated and amplified using PCR. The 16S-rRNA gene of the isolates was then cut using *HaeIII* (5'-GG↓CC) and *HhaI* (5'-GCG↓C) restriction enzymes resulting an ARDRA pattern which was further used as the binary data for the construction of phylogenetics tree that was used to estimate the group of bacteria. The result with *HaeIII* cut restriction enzyme from biofloc-associated bacteria gave 11 ARDRA patterns, while with the restriction enzyme *HhaI* gave eight ARDRA patterns. Phylogenetics of bacterial populations from biofloc-based cultivation system water consisted of at least 13 different bacterial species. Result of sequencing from two gene sample 16S-rRNA were identified as *Microbacterium foliorum* and *Pseudomonas putida*.

Keywords: bacterial diversity, ARDRA, biofloc, phylogeny

#### **ABSTRAK**

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis keragaman genetika bakteri bioflok menggunakan metode *polymerase chain reaction* (PCR) 16S-rRNA dengan teknik ARDRA. Sebanyak 38 isolat bakteri dominan yang diperoleh diamplifikasi gen 16S-rRNANYA dengan PCR, kemudian dipotong dengan enzim restriksi *HaeIII* (5'-GG↓CC) dan *HhaI* (5'-GCG↓C). Pola ARDRA ini dijadikan data biner sebagai input untuk konstruksi pohon filogenetika yang dapat digunakan untuk memerkirakan jenis bakteri yang ada. Gen 16S-rRNA hasil PCR setelah dipotong dengan enzim restriksi *HaeIII* didapatkan 11 pola ARDRA, sedangkan dengan enzim restriksi *HhaI* menghasilkan delapan pola ARDRA. Berdasarkan pohon filogenetika, diketahui populasi bakteri pada air sistem budidaya bioflok sedikitnya terdiri atas 13 jenis bakteri. Berdasarkan sekuensing dari dua sampel gen 16S-rRNA teridentifikasi jenis bakteri *Microbacterium foliorum* dan *Pseudomonas putida*.

Kata kunci: keragaman bakteri, ARDRA, bioflok, filogenetika

#### **PENDAHULUAN**

Peningkatan produksi budidaya melalui penerapan budidaya intensif telah menjadi pilihan untuk menunjang perkembangan industri akuakultur. Sistem budidaya intensif, tingginya kepadatan ikan dan jumlah pakan yang diberikan akan menyebabkan terjadinya akumulasi limbah organik pada lingkungan budidaya. Peningkatan level limbah organik menyebabkan terjadinya peningkatan amonia dan nitrit yang berbahaya bagi spesies budidaya. Metode yang potensial untuk dikembangkan dalam rangka mengurangi limbah ini adalah teknologi bioflok (De Schryver

*et al.*, 2008). Teknologi bioflok ini didasarkan pada kemampuan bakteri heterotrof dalam memanfaatkan nitrogen organik dan anorganik menjadi biomassa bakteri melalui penambahan bahan karbon organik yang dapat meningkatkan C/N rasio perairan (Avnimelech, 2007; De Schryver *et al.*, 2008; Ekasari *et al.*, 2010). Flok bakteri tersusun atas campuran berbagai jenis mikroorganisme (bakteri pembentuk flok, bakteri filamen, fungi), partikel-partikel tersuspensi, berbagai koloid dan polimer organik, berbagai kation dan sel-sel mati (De Schryver *et al.*, 2008). Selain flok bakteri, berbagai jenis organisme lain juga ditemukan dalam bioflok seperti protozoa,

rotifer, dan oligochaeta (Azim *et al.*, 2007; Ekasari *et al.*, 2010). Bakteri merupakan penyusun utama dan memegang peranan penting dalam sistem budidaya dengan teknologi bioflok (De Schryver, 2010). Informasi mengenai keragaman genetika bakteri bioflok sangat berguna untuk mengelola populasi bakteri dan mendapatkan bakteri yang potensial untuk dikembangkan, dalam rangka meningkatkan efektivitas peran bakteri dan pengembangan aplikasi teknologi bioflok.

Aplikasi teknik molekular untuk menganalisis keragaman genetika mikroba baik yang dapat dikultur maupun tidak yaitu analisis gen 16S-rRNA dengan *polymerase chain reaction* (PCR). Gen 16S-rRNA merupakan gen yang terdapat pada semua prokariota dan memiliki bagian atau sekuen konservatif dan sekuen lainnya yang sangat bervariasi (Madigan *et al.*, 2003). Analisis gen 16S-rRNA telah digunakan sebagai parameter sistematik molekular yang universal, representatif, dan praktis untuk mengkonstruksi kekerabatan filogenetik pada tingkat spesies (Madigan *et al.*, 2003). Analisis keragaman genetika yang cepat, sederhana, dan murah untuk menelaah profil DNA gen 16S-rRNA hasil amplifikasi dari PCR dapat dilakukan dengan teknik *amplified ribosomal DNA restriction analysis* (ARDRA). Teknik ARDRA dilakukan dengan cara mengamplifikasi gen 16S-rRNA dengan primer yang disesuaikan dengan sampel DNA yang akan dianalisis (Marchesi *et al.*, 1998). Marchesi *et al.* (1998) telah mendesain primer 63f dan 1387r untuk amplifikasi gen 16S-rRNA yang memungkinkan untuk menduga keragaman bakteri yang berasal dari lingkungan. Hasil amplifikasi 16S-rRNA ini kemudian dipotong dengan enzim restriksi. Pola hasil pemotongan dengan enzim restriksi ini dapat digunakan untuk memperkirakan status dan keragaman genetik dari jenis bakteri yang ada. Metode tersebut didasarkan pada prinsip pemotongan enzim restriksi yang spesifik pada bagian tertentu dari gen 16S-rRNA sehingga dapat menunjukkan pohon filogenetika yang berbeda untuk setiap jenis prokariota. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis keragaman genetika bakteri media pemeliharaan ikan nila pada teknologi budidaya bioflok menggunakan teknik ARDRA.

## BAHAN DAN METODE

Sampel air yang digunakan pada penelitian ini berasal dari media pemeliharaan ikan nila merah *Oreochromis sp.* menggunakan aplikasi teknologi

bioflok. Sumber karbon yang digunakan adalah molase dengan perbandingan C/N 15 (Widanarni *et al.*, 2012). Sampel air diambil seminggu sekali pada masing-masing kepadatan untuk menganalisis jenis bakteri dominan penyusun bioflok.

### Ekstraksi DNA genom bakteri

Hasil isolasi bakteri diperoleh 38 isolat murni, selanjutnya diidentifikasi keragaman genetik bakteri tersebut. Langkah pertama yaitu ekstraksi DNA genom. Pengekstraksian DNA dilakukan menggunakan larutan *cetyltrimethyl ammonium bromide* (CTAB) (modifikasi Murray & Thompson, 1980). Isolat bakteri yang telah murni ditanam dalam media cair *Luria Bertani* (LB), dikocok selama 24 jam pada suhu 28 °C dengan kecepatan 140–160 rpm. Kemudian bakteri dipanen sebanyak 5 mL ke dalam tabung mikro, disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama satu menit dan supernatannya dibuang. Pelet yang telah mengendap dalam tabung mikro dikeringkan dengan cara dibalikkan di atas kertas tisu. Pelet bakteri ditambahkan 500 µL 1× TE bufer, kemudian diresuspensi dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama lima menit. Supernatan dibuang dan pelet sel diresuspensikan kembali dengan 1× TE bufer sebanyak 500 µL, ditambahkan 100 µL lysozym (50 mg/µL) dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama satu jam (setiap 15 menit dibolak-balik). Setelah itu ditambahkan 100 µL NaCl 5M dan 100 µL CTAB, kemudian divorteks dan diinkubasi pada suhu 65 °C selama 20 menit. Selanjutnya ditambahkan 500 µL *phenol:chloroform:isoamyl* alkohol (25:24:1), divorteks selama 30 detik, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama lima menit. Supernatan diambil dan dipindahkan ke dalam tabung mikro steril yang telah berisi 600 µL *isopropanol/etanol absolut* dingin (-20 °C) dan dibolak-balik hingga timbul benang-benang DNA. DNA dalam bentuk pelet dicuci dengan 1 mL etanol 70% dingin dan dikeringkan diudara selama empat sampai 24 jam untuk menguapkan etanol yang masih tersisa. Langkah terakhir dalam ekstraksi DNA adalah penambahan 1×TE bufer 20–30 µL tergantung jumlah pelet yang terbentuk. Kemudian DNA disimpan pada suhu -20 °C untuk keperluan selanjutnya.

### Amplifikasi gen 16S-rRNA

Isolat DNA sebanyak 0,5 µL dimasukkan ke dalam tabung PCR yang berisi 15,1 µL ddH<sub>2</sub>O, 2,5 µL dNTP 2,5 mM, 0,4 µL

enzim *Taq Polimerase* 5 U/ $\mu$ L, 2,5  $\mu$ L 10 $\times$  *Taq bufer with* (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1  $\mu$ L primer 63f (5'-CAGGCCTAACA CATGCAAGTC) 5 pmol, 1  $\mu$ L primer 1387r (5'-GGGCGGWGTGTACAAGGC) 5 pmol (Marchesi *et al.*, 1998). PCR dilakukan menggunakan PCR *GeneAmp*®PCR System 2400, Perkin Elmer, USA dengan kondisi: *Pre start* 94 °C dua menit; *denaturasi* 92 °C dua menit, *annealing primer* 55 °C 30 detik, *extension* 75 °C satu menit yang dilakukan sebanyak 30 siklus; *post PCR* 72 °C 20 menit. Setelah itu, suhu diturunkan dan diakhiri pada 4 °C.

#### **Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)**

Hasil amplifikasi gen 16S-rRNA dari masing-masing sampel dipotong menggunakan enzim restriksi *HaeIII* (5'-GG↓CC) dan *HhaI* (5'-GCG↓C) (EU, *PureExtreme*<sup>TM</sup> Fermentas). Setiap reaksi pemotongan terdiri atas 5  $\mu$ L hasil PCR (gen 16S-rRNA), 1,5  $\mu$ L 10 $\times$  *buffer* enzim restriksi, 1  $\mu$ L enzim restriksi 2 unit/ $\mu$ L, dan 7,5  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O. Selanjutnya setiap tabung yang berisi reaksi di atas, diinkubasi 37 °C selama 16 jam. Hasil pemotongan kemudian dielektroforesis, dan diamati di atas lampu UV untuk melihat pola ARDRA. Pola ARDRA ini dijadikan data biner sebagai input untuk konstruksi pohon filogenetika.

#### **Elektroforesis**

Gel agarosa dibuat dengan melarutkan serbuk gel agarosa sebanyak 0,8–1,9% dalam 30 mL larutan *tris boric EDTA* (TBE) yang mengandung *ethidium bromida* (0,01 g/mL). Kemudian dipanaskan dalam *microwave* sampai larutan menjadi berwarna bening. Larutan didiamkan sampai hangat lalu dituangkan ke dalam cetakan yang sudah terpasang sisir pembuat sumur. Kemudian gel dibiarkan membeku. Setelah itu, sisir dilepaskan dan padatan gel dimasukkan ke dalam bak elektroforesis yang berisi *buffer* TBE.

Sampel DNA sebanyak 1–3  $\mu$ L dicampurkan dengan 0,5  $\mu$ L *loading dye*, lalu dimasukkan ke dalam sumur yang terdapat dalam gel menggunakan pipet mikro. Setelah itu, 2  $\mu$ L marker DNA dimasukkan ke dalam sumur di dekat sumur sampel. Bak elektroforesis ditutup dan listrik dialirkan dengan tegangan 150 volt dan kuat arus 80 mA. Lalu DNA akan bermigrasi dari kutub negatif ke positif. Setelah *bromophenol blue* bermigrasi sampai tiga per empat bagian dari panjang gel, aliran listrik dihentikan. Lalu gel diangkat dan dilepaskan dari cetaknya.

Kemudian keberadaan DNA dilihat dengan ultraviolet *illuminator* melalui kamera digital Canon®*Powershot* A640 yang sudah terhubung ke komputer dengan pemotretan secara otomatis menggunakan bantuan *software (image capture)*.

#### **Konstruksi pohon filogenetika dari pola ARDRA**

Data biner hasil pemotongan dengan dua macam enzim restriksi digabungkan untuk tiap sampel dan dimasukkan dalam program *Treecon software copyright* (c) Yves van de Peer (Belgia) untuk konstruksi pohon filogenetika.

#### **Isolasi bakteri**

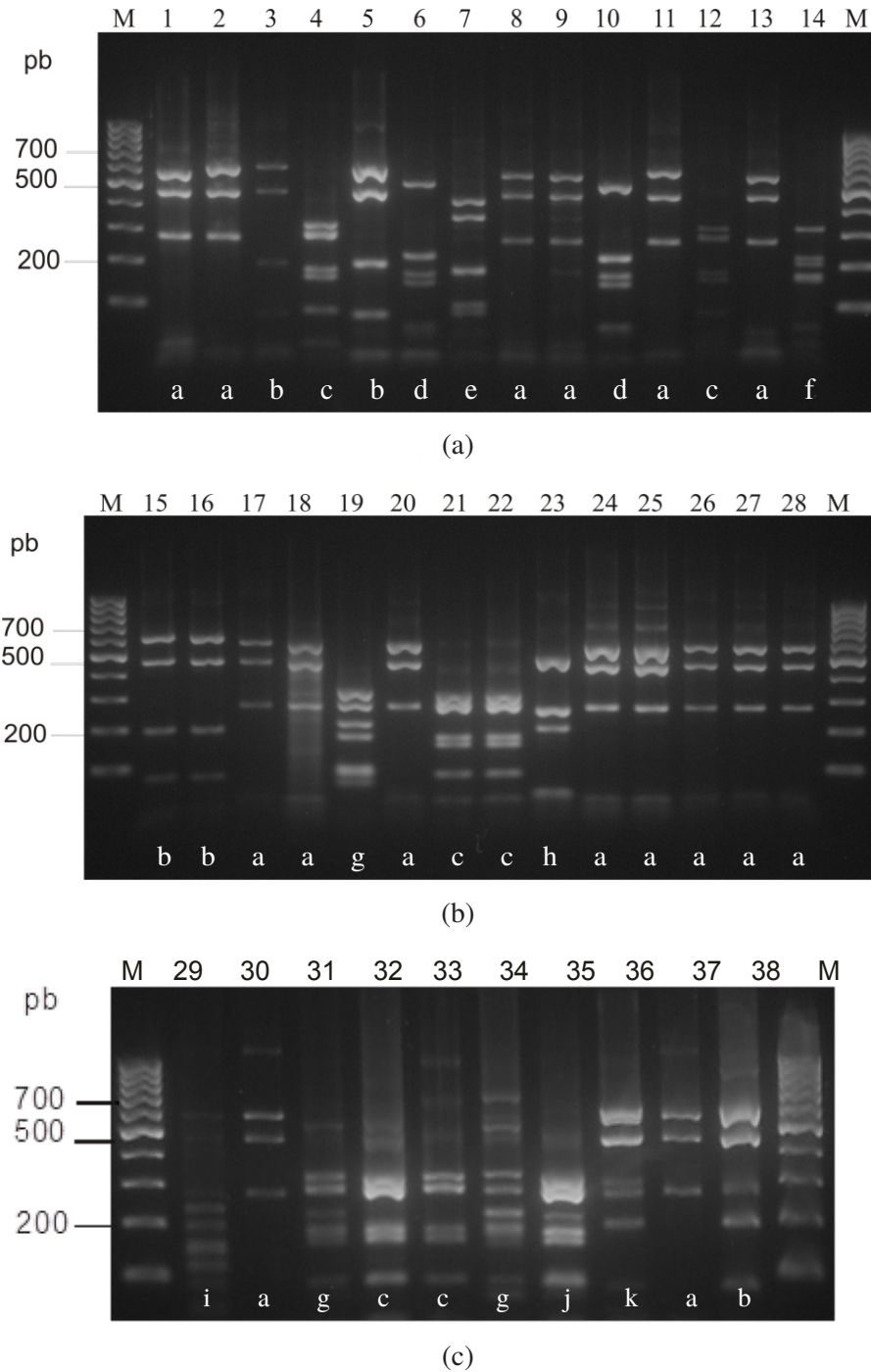
Jenis bakteri dominan penyusun bioflok diperoleh dari hasil isolasi bakteri yang tumbuh dominan dilihat dari bentuk koloni, pigmentasi, dan morfologinya secara visual. Setelah itu, bakteri tersebut dimurnikan dengan metode kuadran hingga mendapatkan koloni tunggal. Isolat murni kemudian dilakukan identifikasi berdasarkan sifat fisiologi dan biokimia, meliputi: pewarnaan gram; uji motilitas; uji katalase; uji sitokrom oksidase; uji oksidatif/fermentatif.

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **Hasil**

Hasil amplifikasi gen 16S-rRNA dari 38 isolat murni yang diperoleh menggunakan PCR, didapatkan fragmen gen 16S-rRNA dengan ukuran ~1400 bp. Gen 16S-rRNA hasil PCR kemudian dipotong dengan enzim restriksi *HaeIII* dan *HhaI*. Hasil pemotongan dengan enzim restriksi *HaeIII* diperoleh 11 pola ARDRA, yaitu a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k (Gambar 1). Hasil pemotongan pita DNA dengan enzim restriksi *HhaI* diperoleh delapan pola ARDRA, yaitu pola A, B, C, D, E, F, G, H (Gambar 2).

Pohon filogenetika menunjukkan keragaman genetik dari populasi bakteri. Berdasarkan pohon filogenetika, terlihat bahwa dari 38 isolat yang diperoleh dapat dibedakan menjadi 13 pola filotipe (Gambar 3). Adapun 13 pola filotipe tersebut, yaitu pola (1) filotipe pada sampel 4, 12, 21, 22, 32, 33, (2) filotipe pada sampel 31 dan 35, (3) filotipe sampel 6 dan 10, (4) filotipe sampel 7, (5) filotipe sampel 19 dan 34, (6) filotipe sampel 14, (7) filotipe sampel 29, (8) filotipe sampel 23, (9) filotipe sampel 36, (10) filotipe sampel 2, dan 11, (11) pola filotipe 36, (12) filotipe sampel 3, 5, 15, dan 16, dan (13) pola filotipe 1, 8, 9, 13, 17, 18, 20, 24, 25, 26, 27, 28, 30, dan 37 (Gambar 3).



Gambar 1. Elektroforegraf gel agarosa hasil pemotongan gen 16S-rRNA dengan enzim restriksi *Hae*III untuk 38 isolat bakteri (A: urutan 1–14, B: 15–28, C: 29–38) dari sampel air bioflok. Keterangan: M: standar ukuran molekul (*Gene Ruler*<sup>TM</sup> DNA ladder 100 pb, Fermentas); 1–38: urutan nomor isolat bakteri; a–k: pola ARDRA.

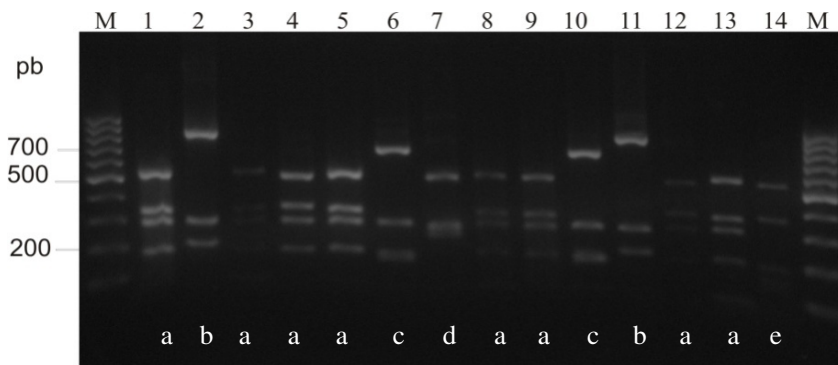
Jenis bakteri dominan penyusun bioflok terdapat pada filotipe 13 dan 1 (Tabel 1). Berdasarkan hasil identifikasi fisiologi dan biokimia menunjukkan bahwa jenis bakteri pada filotipe 13 dan 1 berasal dari genus *Bacillus*, *Kurthia*, *Listeria*, *Alcaligenes*, *Enterobacteria*, dan *Acinobacter* (Tabel 1).

#### Pembahasan

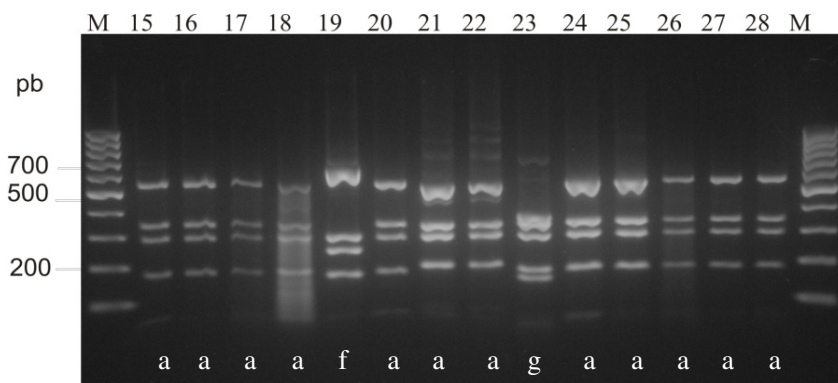
Fragmen gen 16S-rRNA yang dihasilkan dari 38 isolat bakteri dominan yang diamplifikasi

dengan PCR memiliki ukuran ~1.400 bp. Gen 16S-rRNA hasil PCR setelah dipotong dengan enzim restriksi *Hae*III dari bakteri bioflok didapatkan 11 pola ARDRA, yaitu pola a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k (Gambar 1). Sementara itu, enzim restriksi *Hha*I menghasilkan delapan pola ARDRA, yaitu pola A, B, C, D, E, F, G, H (Gambar 2). Perbandingan hasil pemotongan kedua enzim restriksi untuk gen 16S-rRNA sebanyak 38 sampel menunjukkan adanya pola

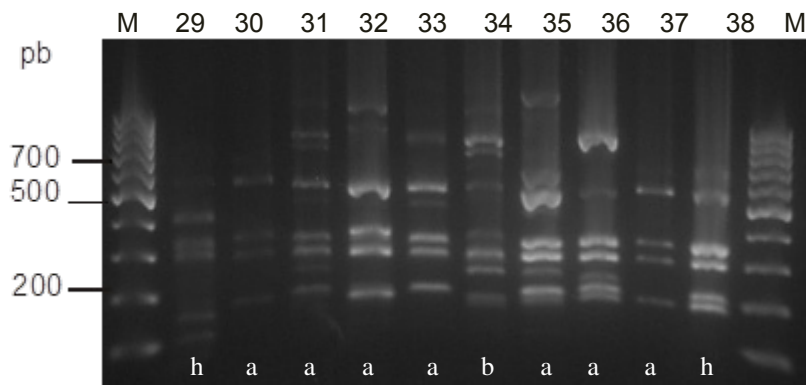




(a)



(b)

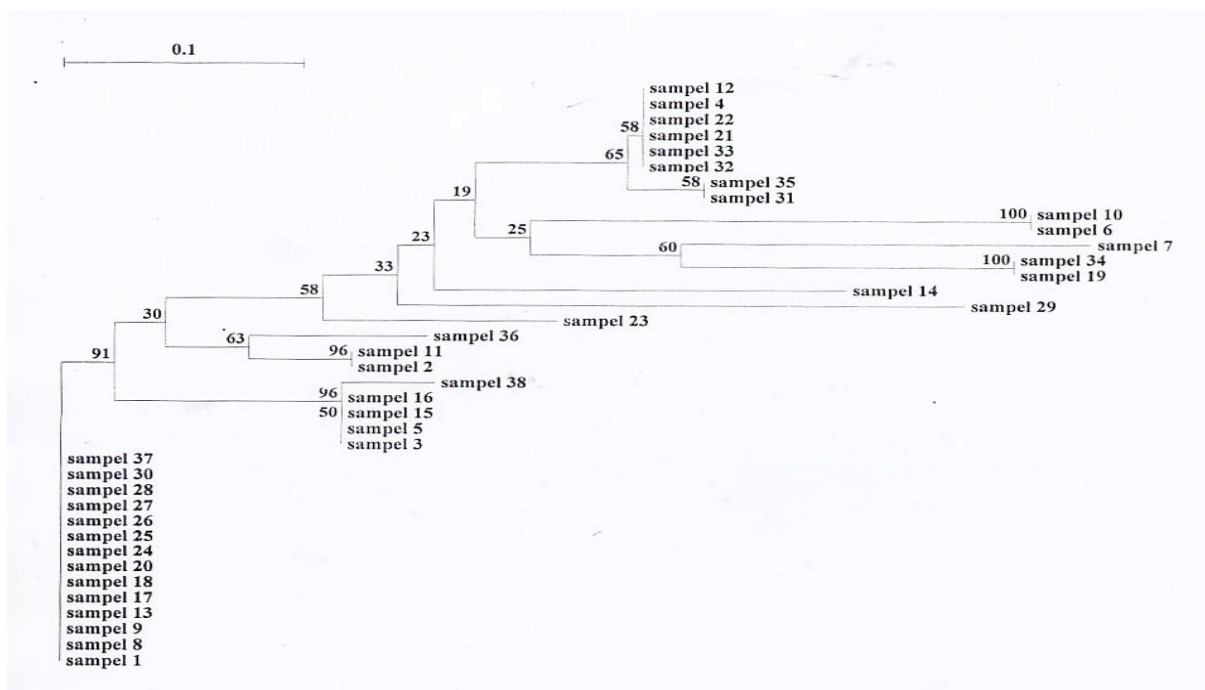


(c)

Gambar 2. Elektroforegraf gel agarosa hasil pemotongan gen 16S-rRNA dengan enzim restriksi *HhaI* untuk 38 (A: urutan 1–14, B: 15–28, C: 29–38) isolat bakteri dari sampel air bioflok. M: standar ukuran molekul (*Gene Ruler*<sup>TM</sup> DNA ladder 100 pb, Fermentas); 1–38: urutan nomor isolat bakteri; a–h: pola ARDRA.

ARDRA yang dominan, baik enzim restriksi *HaeIII* (Gambar 1), maupun enzim restriksi *HhaI* (Gambar 2). Hasil pemotongan dengan enzim restriksi *HaeIII* menghasilkan 11 pola ARDRA dan dominan pada pola pemotongan a dengan kode sampel 1, 2, 8, 9, 11, 13, 17, 18, 23, 24, 25, 26, 27, dan 28. Hasil pemotongan dengan *HhaI* menghasilkan delapan pola ARDRA dan dominan pada pola pemotongan A dengan kode sampel 1, 3, 4, 5, 8, 9, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 35, dan 37. Pola yang dominan ini menunjukkan bahwa bakteri

pada air sistem budidaya bioflok didominasi oleh jenis bakteri yang memiliki pola pemotongan yang sama. Pola tersebut mengindikasikan jenis bakteri yang sejenis atau diduga memiliki hubungan kekerabatan yang dekat antara bakteri tersebut. Daerah yang dikenali maupun daerah yang dipotong enzim tersebut terletak pada bagian yang sama karena enzim endonuklease restriksi memiliki urutan nukleotida yang dikenali secara spesifik. Pola pemotongan tersebut menunjukkan adanya urutan nukleotida yang sama pada bakteri-bakteri tersebut. Hal ini sesuai dengan



Gambar 3. Pohon filogenetika 13 filotipe bakteri dari sampel media pemeliharaan ikan nila merah *Oreochromis* sp. dengan aplikasi bioflok menggunakan enzim restriksi *Hae*III dan *Hha*I.

Tabel 1. Kelompok bakteri dominan dalam sampel air media pemeliharaan ikan nila merah *Oreochromis* sp. dengan aplikasi bioflok

Kelompok bakteri dominan	Kode sampel	Kelompok genus
Filotipe 13	17, 18, 24	<i>Bacillus</i>
	26, 27, 32	<i>Bacillus</i>
	1, 8, 25	<i>Kurthia</i>
	9, 13, 28	<i>Listeria</i>
	12, 32	<i>Alcaligenes</i>
Filotipe 1	4, 21, 22	<i>Enterobacteria</i>
	33	<i>Acinetobacter</i>

pernyataan Madigan *et al.*, (2003), bahwa enzim endonuklease restriksi tipe II dapat dibedakan atas urutan nukleotida yang dikenali yaitu dapat berupa urutan empat, lima, atau enam basa yang spesifik. Daerah yang dipotong enzim tersebut bersifat spesifik dan terletak pada bagian yang sama.

Mengacu pada pohon filogenetika terlihat bahwa dari 38 sampel dapat dibedakan 13 filotipe (Gambar 3), maka populasi bakteri pada air sistem budidaya bioflok sedikitnya terdiri atas 13 jenis bakteri yang berbeda dari segi keragaman genetiknya. Banyaknya jenis bakteri dilihat dari sampel yang memiliki filotipe yang berbeda, yaitu pola (1) filotipe pada sampel 4, 12, 21, 22, 32, 33, (2) filotipe pada sampel 31 dan 35, (3) filotipe sampel 6 dan 10, (4) filotipe sampel 7, (5) filotipe sampel 19 dan 34, (6) filotipe sampel 14, (7) filotipe sampel 29, (8) filotipe sampel 23,

(9) filotipe sampel 36, (10) filotipe sampel 2, dan 11, (11) pola filotipe 36, (12) filotipe sampel 3, 5, 15, dan 16, dan (13) pola filotipe 1, 8, 9, 13, 17, 18, 20, 24, 25, 26, 27, 28, 30 dan 37. Bakteri yang memiliki filotipe yang berbeda antara 38 sampel bakteri tersebut menunjukkan adanya pola keragaman yang berbeda.

Berdasarkan pohon filogenetika diketahui terdapat jenis bakteri yang memiliki filotipe sama dan memiliki jumlah lebih dominan dibandingkan dengan jenis bakteri lainnya. Bakteri dominan pertama adalah kelompok filotipe 13. Kelompok bakteri ini terdiri atas sampel nomor 1, 8, 9, 17, 18, 20, 24, 25, 26, 27, 28, 30, dan 37. Secara umum, bakteri dominan ini merupakan kelompok bakteri heterotrof, gram positif dan berbentuk batang. Hasil identifikasi berdasarkan pengamatan morfologi, fisiologi, dan biokimia menunjukkan bahwa bakteri dominan ini berasal dari kelompok

genus *Bacillus*, *Kurthia*, dan *Listeria* (Tabel 1).

Bakteri dominan lainnya adalah kelompok filotipe 1. Kelompok bakteri ini terdiri dari sampel nomor 4, 12, 21, 22, 32, dan 33. Secara umum, bakteri dominan ini merupakan kelompok bakteri heterotrof, gram negatif dan berbentuk batang dan bulat. Hasil identifikasi berdasarkan pengamatan morfologi, fisiologi, dan biokimia menunjukkan bahwa bakteri ini berasal dari kelompok genus *Alcaligenes*, *Enterobacteria*, dan *Acinetobacter* (Tabel 1).

Beberapa kelompok bakteri ini diduga merupakan kelompok bakteri yang berperan dalam proses denitrifikasi. Bakteri denitrifikasi anaerobik seperti *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium-Bacterioides-Cytopaga* group berperan penting dalam menurunkan kadar nitrat dan nitrit menjadi nitrogen molekuler yang terdapat pada air (Michaud *et al.*, 2006). Jenis mikroorganisme ini digolongkan ke dalam kelompok kemoheterotrof, yaitu kelompok mikroorganisme yang kebutuhan haranya diperoleh dari penguraian senyawa-senyawa organik. Denitrifikasi merupakan proses pernafasan anaerob oleh bakteri yang menggunakan nitrat sebagai penerima elektron terakhir dan menghasilkan gas nitrogen melalui perantara nitrit, nitrat, dan oksida nitrat. Jeter *et al.* (1984) menyebutkan terdapat 73 daftar genus yang mampu melakukan aktivitas denitrifikasi, diantaranya adalah bakteri heterotrof perairan umum seperti *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, dan *Vibrio*. Selain itu, penelitian lain menyebutkan bahwa *Bacillus* merupakan salah satu kelompok bakteri yang telah dimanfaatkan sebagai bakteri probiotik di bidang akuakultur. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa bakteri kelompok *Bacillus* sebagai probiotik secara signifikan dapat meningkatkan kualitas air (Nimrat *et al.*, 2011; Nimrat *et al.*, 2012), rasio konversi pakan (FCR), laju pertumbuhan (SGR), rasio konversi protein (PER) (Merrifield *et al.*, 2010), peningkatan respons imun dan resistensi terhadap penyakit (Li *et al.*, 2009).

Bakteri heterotrof menjadi komponen utama yang menyusun bakteri bioflok (Hargreaves *et al.*, 2006). Crab *et al.* (2007) juga menyatakan bahwa bakteri heterotrof dominan pada sistem bioflok karena proses nitrifikasi dihambat oleh penambahan karbon organik sehingga penambahan pakan berbahan baku biji-bijian dan molase dapat meningkatkan pertumbuhan bakteri heterotrof dan membatasi nitrifikasi. Menurut Hargreaves (2006) peningkatan pengambilan

nitrogen karena pertumbuhan bakteri dapat menurunkan konsentrasi amonium dengan cepat daripada nitrifikasi. Kondisi ini menyebabkan makin cepat terjadinya proses perbaikan kualitas air pada kolam akuakultur dengan *zero* atau minimal pertukaran air. Kualitas air dalam penelitian ini menunjukkan bahwa kualitas air pada kolam pemeliharaan bioflok lebih baik daripada kontrol (Widanarni *et al.*, 2012). Hal tersebut diduga, bakteri nitrifikasi autotrof seperti *Nitrosomonas* sp., *Nitrobacter* sp., *Nitrosococcus* sp. (mengkonversi amonium menjadi nitrit), dan *Nitrococcus* sp., serta *Nitrospira* sp. (mengkonversi nitrit menjadi nitrat) juga tumbuh pada media pemeliharaan dalam sistem budidaya bioflok namun jumlahnya tidak dominan. Bakteri-bakteri autotrof, terutama kelompok bakteri nitrifikasi seringkali ditemukan meskipun dalam jumlah sedikit dan memiliki peran kecil (Hargreaves, 2006).

## KESIMPULAN

Analisis genetika bakteri menggunakan ARDRA dari sampel yang menggunakan teknologi budidaya bioflok pada media pemeliharaan ikan nila merah, minimal terdapat 13 jenis bakteri yang berbeda dan hasil sekuensing dari dua sampel gen 16S-rRNA adalah *Microbacterium foliurum* dan *Pseudomonas putida*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Avnimelech Y. 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge biofloc technology ponds. *Aquaculture* 264: 140–147.
- Azim ME, Little DC, Bron IE. 2007. Microbial protein production in activated suspension tanks manipulating C/N ratio in feed and implications for fish culture. *Bioresource Technology* 99: 3.590–3.599.
- Crab R, Avnimelech Y, Defroidt T, Bossier P, Verstraete W. 2007. Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture* 270: 1–14.
- De Schryver P, Crab R, Defoidt T, Boon N, Verstraete W. 2008. The basic of biofloc technology: the added value for aquaculture. *Aquaculture* 277: 125–137.
- De Schryver P, Sinha AK, Kunwar PS, Baruah K, Verstraete W. 2010. Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) increases growth performance and intestinal bacterial range-weighted richness in juvenile European seabass *Dicentrarchus*

- labrax*. Applied Microbiology and Biotechnology 86: 1.535–1.541.
- Ekasari J, Crab R, Willy V. 2010. Primary nutritional content of bio-flocs cultured with different organic carbon sources and salinity. Hayati 17: 125–130.
- Hargreaves JA. 2006. Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. Aquacultural Engineering 34: 344–363.
- Jeter RM, Sias SR, Ingraham JL. 1984. Chromosomal location and function of genes affecting *Pseudomonas aeruginosa* nitrate assimilation. Journal of Bacteriology 157: 673–677.
- Li J, Tan B, Mai K. 2009. Dietary probiotic *Bacillus* OJ and isomaltooligosaccharides influence the intestine microbial populations, immune responses and resistance to white spot syndrome virus in shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 291: 35–40.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 2003. Brock Biology of Microorganisms. Tenth Edition. USA: Prentice-Hall Inc.
- Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, Martin TA, Fry JC, Hiom SJ, Wade WE. 1998. Design and evaluation of useful bacterium specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S-rRNA. Applied and Environmental Microbiology 64: 795–799.
- Merrifield DL, Dimitoglou A, Foey A, Davies SJ, Baker RTM, Bøggwald J, Castex M, Ringø E. 2010. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. Aquaculture 302: 1–18.
- Michaud L, Blancheton JP, Bruni V, Piedrahita R. 2006. Effect particulate organic carbon on heterotrophic bacterial populations and nitrification efficiency in biological filters. Aquacultural Engineering 34: 224–233.
- Murray MG, Thompson WF. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research 8: 4.321–4.325
- Nimrat S, Boonthai T, Vuthiphandchai V. 2011. Effects of probiotic forms, compositions of and mode of probiotic administration on rearing of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* larvae and postlarvae. Animal Feed Science and Technology 169: 244–258.
- Nimrat S, Suksawat S, Boonthai T, Vuthiphandchai V. 2012. Potential *Bacillus* probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Veterinary Microbiology 159: 443–450.
- Widanarni, Ekasari J, Maryam S. 2012. Evaluation of biofloc technology application on water quality and production performance of red tilapia *Oreochromis* sp. cultured at different stocking densities. Journal of Biosciences 2: 73–80.