

Original Research Paper

Identifikasi Bakteri Air Sungai Ciwalen Garut Menggunakan *Next Generation Sequencing of 16S Ribosomal RNA*

Bacteria Analysis In the Ciwalen River Garut Using Next Generation Sequencing of 16S Ribosomal RNA

Tati Kristianti^{1*} & Lida Amalia¹

¹Institut Pendidikan Indonesia, Jl. Pahlawan no. 32 Tarogong Kaler – Garut – Indonesia, post code 44151
Corresponding author: *tati@institutpendidikan.ac.id

Abstrak: Sungai Ciwalen mengalir melalui Kota Garut, Provinsi Jawa Barat, Indonesia. Sungai ini berbatasan dengan ratusan usaha penyamakan kulit hewan dan limbah toilet masyarakat. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisis bakteri pada air sungai Ciwalen dengan menggunakan metode Next Generation Sequencing (NGS) gen RNA ribosom 16s dengan primer V1-V9, yang akan mengamplifikasi seluruh panjang gen rRNA dan memungkinkan identifikasi spesies. Data mengungkapkan terdapat 104.000 bacaan, 150.232.539 basa, dan 81.761 spesies bakteri. *Proteiniclasticum ruminis*, *Fusibacter ferrireducens*, *Fusibacter fontis*, *Fusibacter tunisiensis*, *Paludibacter propionicigenes*, *Arcobacter cloacae*, *Alishewanella jeotgali*, *Thiovirga sulfuroxydans*, *Pseudomonas fluvialis*, dan *Thauera mechernichensis* adalah spesies bakteri dominan. Dalam penelitian ini juga ditemukan bakteri *Klebsiella pneumoniae* yang diketahui mampu mendegradasi logam berat kromium, timbal dan kadmium (Cr, Pb dan Cd). Profil bakteri serta presentasi keberadaannya pada sampel air ini menunjukkan kesesuaian keberadaan logam berat dari limbah penyamakan kulit di sungai Ciwalen.

Kata kunci : Sungai Ciwalen, NGS 16s, ribosomal RNA, V1 – V9 regions

Abstract: The Ciwalen River flows through Garut city, West Java, Indonesia. This river is bordered by hundreds of leather tanning enterprises and community toilet waste. The purpose of this research is to analyse bacteria in Ciwalen river water using the Next Generation Sequencing (NGS) method for the 16s ribosomal RNA gene using V1-V9 primer pairs, which will amplify the entire length of the rRNA gene and allow for species identification. The data revealed that there were 104,000 reads, 150,232,539 bases, and 81,761 bacterial species. *Proteiniclasticum ruminis*, *Fusibacter ferrireducens*, *Fusibacter fontis*, *Fusibacter tunisiensis*, *Paludibacter propionicigenes*, *Arcobacter cloacae*, *Alishewanella jeotgali*, *Thiovirga sulfuroxydans*, *Pseudomonas fluvialis*, and *Thauera mechernichensis* are the main bacterial species. In this study, another bacteria, *Klebsiella pneumoniae*, was also found which is known to degrade heavy metals, chromium, timbal & cadmium (Cr, Pb and Cd). The profile of bacteria, as well as the presentation of their existence in this water sample, demonstrates the appropriateness of heavy metals from leather tannery waste in the Ciwalen river.

Keywords: Ciwalen River, NGS 16s, ribosomal RNA, V1 – V9 regions

Dikumpulkan: 7 November 2023 Direvisi: 23 November 2023 Diterima: 29 November 2023 Dipublikasi: 28 Desember 2023

Pendahuluan

Sungai adalah tempat-tempat dan wadah-wadah serta jaringan pengaliran air mulai dari mata air sampai muara dengan dibatasi kanan dan kirinya serta sepanjang pengalirannya oleh garis sempadan yang berfungsi sebagai sumber air yang sangat penting untuk memenuhi kebutuhan hidup masyarakat dan dalam meningkatkan pembangunan nasional (Peraturan Pemerintah No. 35 Tahun 1991). Berdasarkan uraian di atas, dapat diambil kesimpulan bahwa sungai adalah suatu wadah atau saluran alami maupun buatan yang didalamnya tidak hanya menampung air tetapi juga mengalir dari hulu sampai ke muara sungai. Sungai dan manusia memiliki hubungan yang erat karena sungai sangat penting bagi kelangsungan hidup manusia. Bagi sebagian besar masyarakat, sungai berfungsi sebagai penyedia air untuk kebutuhan sehari-hari. Oleh karena itu, kondisi sungai yang sehat harus selalu dijaga.

Saat ini, kondisi air sungai terancam oleh adanya pembuangan sampah industri dan rumah tangga langsung ke sungai. Sungai Ciwalen mengalir melalui Garut yang berbatasan dengan ratusan usaha penyamakan kulit dan limbah toilet masyarakat. Sukaregang-Garut merupakan sentra produksi penyamakan kulit hewan (domba, sapi, kambing dan kerbau) Indonesia yang membuang sampahnya langsung ke Sungai Ciwalen dan Cigulampeng tanpa diolah terlebih dahulu. Volume sampah harian yang dihasilkan sekitar 6.000 m³/hari (Priyanto, 2006). Limbah dapat membahayakan kesehatan masyarakat, kandungan bahan organik yang tinggi dapat menjadi sumber makanan yang baik bagi perkembangan organisme. Disisi lain limbah pada suatu lingkungan tertentu dapat menghambat pertumbuhan bakteri baik dari segi jumlah maupun keanekaragaman spesiesnya. Meskipun demikian, mikroorganisme tertentu seringkali ditemukan lebih tahan terhadap kondisi ini. Begitu pula dengan limbah penyamakan kulit. Bakteri yang dapat tumbuh subur pada limbah penyamakan kulit memiliki proses metabolisme yang dapat dimanfaatkan sebagai agen bioremediasi di habitat aslinya. Sulistinah & Sunarko (2020) dengan menggunakan prosedur *Enhanced Culture*, berhasil mengisolasi bakteri pendegradasi nitrit dan benzonitrit dari limbah penyamakan kulit Garut. Skrining bakteri dengan pendekatan *enrichment culture* (kultur pengayaan) ini memiliki keterbatasan yaitu hanya mengumpulkan bakteri

yang dapat ditumbuhkan, atau ada pula yang tidak dapat dibiakkan karena ketidakcocokan media pertumbuhan yang digunakan. Namun keberadaan bakteri yang tidak dapat dibiakkan tidak terungkap. Akibatnya, gambaran total mikroorganisme yang ada tidak diketahui.

Tujuan penelitian ini adalah menganalisis bakteri air sungai Ciwalen dengan menggunakan metode *Next Generation Sequencing* (NGS) pada gen RNA ribosom 16s. Primer yang digunakan adalah primer V1-V9 dari rangkaian rRNA 16s, yang akan mengamplifikasi seluruh panjang gen rRNA dan memungkinkan identifikasi spesies. Jika dibandingkan dengan prosedur lain, pendekatan *Next Generation Sequencing* dapat menemukan variasi dasar yang sebenarnya (Chen *et al.*, 2017). Metode NGS memiliki kemampuan identifikasi basa yang lebih presisi dibandingkan metode identifikasi uji konvensional dengan mengenali area gen 16S-23S rRNA (Sabat *et al.*, 2017). Temuan analisis NGS dapat memberikan gambaran profil bakteri secara akurat, yang akan menunjukkan dominasi bakteri secara umum. Study ini merupakan karya ilmiah pertama di Indonesia mengenai analisis bakteri air sungai Ciwalen Garut dengan menggunakan teknologi NGS.

Bahan dan Metode Area penelitian

Sungai Ciwalen mengalir melalui Desa Regol di Kecamatan Garut Kota Kabupaten Garut. Letaknya pada 7°13'14' Lintang Selatan dan 107°54'40' Bujur Timur. Panjangnya kurang lebih 5 kilometer dan berakhir di Sungai Cimanuk.

Sampling

Pengambilan sample dilakukan pada bulan Juli 2023. Sampel air sungai Ciwalen dikumpulkan dan disimpan dalam tabung elang 50 mL untuk dianalisis profil fisik/kimia/biologi (pH, suhu, logam berat (Fe, Pb, Cu, Cr, Zn, dan Hg), N, COD, BOD, dan TSS). Sampel sebanyak 100 mg ditempatkan dalam falcon 50 mL dan disimpan pada suhu -20°C sebelum dipisahkan dari DNA genom.

Parameter uji air sungai

Analisis parameter uji air sungai dilakukan di Laboratorium PT. CHEMSLAB – Bandung. Adapun parameter yang diuji adalah: oksigen terlarut (DO), beberapa logam berat, NH₃-N, N-total, TSS, pH, dan suhu air diukur dengan alat YSI 5000 DO meter, pH meter digital, dan termometer digital. APHA (2017) digunakan untuk menghitung Biological Oxygen Demand (BOD) dan Chemical Oxygen Demand (COD).

Isolasi DNA

Kit isolasi DNA Zymo Research digunakan untuk mengisolasi DNA dari sampel air. DNA genom divalidasi sebagai genom prokariota menggunakan primer 16s rRNA Primer 27F-M (27F-YM: 5'-AGAGTTGATYMTGGCTCAG-3') dan Primer 1492R (5'-GGTACTTGTACGACTT-3'), yang mengamplifikasi gen RNA ribosom pada ukuran sekitar 1500bp. Untuk setiap reaksi PCR, 2 ul DNA genom digunakan sebagai *template* PCR. Reaksi PCR mengandung 25 ul MyTaq Red Mix 2x, 2,5 ul Primer 27F-M dan Primer 1492R pada konsentrasi 0,5uM, dan 18 ul ddH₂O. Pradenaturasi pada suhu 95°C selama satu menit, dilanjutkan dengan 25 siklus pada suhu 95°C selama 15 detik, annealing pada suhu 52°C selama 15 detik, ekstensi pada suhu 72°C selama 45 detik, dan ekstensi akhir pada suhu 72°C selama sepuluh menit. Elektroforesis gel pada gel agarosa 1% (b/v) yang diwarnai dengan etidium bromida digunakan untuk memvisualisasikan hasil PCR. Analisis rRNA NGS 16s dilakukan pada sampel DNA yang diberikan kepada PT. Genetika Science Indonesia.

1.1 Analisis Next Generation Sequencing (NGS)

Analisis *Next Generation Sequencing* (NGS) 16s rRNA Software MinKNOW versi 23.04.5 digunakan untuk analisis rRNA NGS 16s di PT. Genetika Science Indonesia. Spektrofotometer NanoDrop dan fluorometer Qubit digunakan untuk mengukur konsentrasi DNA. Kit Teknologi Oxford Nanopore digunakan untuk menyiapkan *library sample*. Program Guppy versi 6.5.7 digunakan untuk analisis basecalling (Bahram et al., 2018). Kualitas file FASTQ ditampilkan dengan NanoPlot dan disaring dengan NanoFilt (de Coster et al., 2018; Nygaard et al., 2020). Klasifikasi reads menggunakan metode Kim et al. (2016). Database 16S dari NCBI (<https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/TargetedLoci/>) sebagai referensi digunakan untuk membuat indek bakteri dan archaea. Program Pavian (<https://github.com/fbreitwieser/pavian>),

Krona Tools (<https://github.com/marbl/Krona>), dan RStudio dengan versi 4.2.3 (<https://github.com/marbl/Krona>) digunakan untuk identifikasi lebih detil bakteri dan archaea dan visualisasinya menggunakan <https://www.R-project.org/>.

Hasil dan Diskusi

Sungai Ciwalen mengalir melalui Garut yang berbatasan dengan ratusan usaha penyamakan kulit dan limbah toilet masyarakat. Tabel 1 menunjukkan hasil studi parameter sampel air sungai Ciwalen-Garut. PH air Sungai Ciwalen adalah 8,87 yang termasuk dalam kriteria mutu 6 – 9. Air Sungai Ciwalen memiliki nilai TSS (*Total Suspended Solid*) sebesar 549 mg/L. Hasil ini lebih dari ambang batas kualitas normal yaitu 400. Karena nilai TSS erat kaitannya dengan kecerahan air, juga akan berhubungan dengan banyaknya sinar matahari yang menembus air sungai. Kondisi air sungai Ciwalen-Garut sangat memprihatinkan; Selain berbau busuk, warna air sungai pun berubah menjadi abu-abu kehitaman (Gambar 1).



Gambar 1. Kondisi Sungai Ciwalen saat pengambilan sample air pada bulan Juli 2023

Sedangkan air Sungai Ciwalen memiliki Biological Oxygen Demand (BOD) sebesar 980,12 mg/L. Angka ini sangat tinggi, di atas batas ambang batas golongan 4 sebesar 12 mg/L (Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No. 82 Tahun 2001). Nilai BOD mencerminkan jumlah oksigen terlarut yang dibutuhkan oleh mikroorganisme untuk menguraikan bahan organik secara aerobik. Nilai BOD yang tinggi menunjukkan kandungan bahan organik yang tinggi, sehingga berarti sungai Ciwalen mempunyai tingkat pencemaran air limbah yang tinggi. Temuan pengujian sampel air menunjukkan nilai COD air sungai Ciwalen

sebesar 282,05 mg/L. Nilai COD mewakili jumlah oksigen yang dibutuhkan untuk mendegradasi senyawa organik secara kimia; baik bahan organik yang mudah terurai maupun yang sulit terurai akan teroksidasi. Hasil COD ini juga jauh lebih tinggi dibandingkan nilai ambang batas kelas 4 sebesar 100 mg/L (Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No. 82 Tahun 2001).

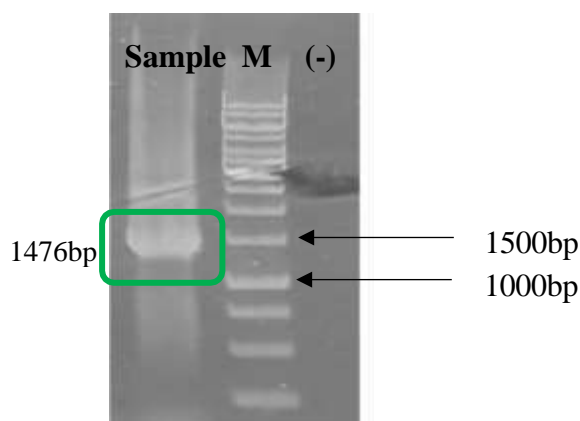
Tabel.1. Hasil analisis parameter air sungai Ciwalen

Parameter	Nilai	Baku mutu (mg/L)
pH	8.87	6 - 9
COD	282.05	10-80
BOD	86.54	2-12
TSS	549	40-400
Zn	<0.02	0.05-2
Pb	<0.06	0.03-0.5
Cd	<0.01	0.01
Fe	6.021	0.3
Cr	0.132	0.05-1
Cu	<0.01	0.02-0.2
N Total	11.935	25
NH3-N	10.213	0.5

Hal ini menunjukkan tingginya tingkat pencemaran sungai oleh bahan kimia organik yang biasanya dapat teroksidasi melalui proses mikrobiologi, sehingga mengakibatkan penurunan oksigen terlarut dalam air. Kandungan parameter N total merupakan penjumlahan dari konsentrasi NO₂, NO₃, NH₄, dan N-organik. Air sungai Ciwalen memiliki nilai nitrogen total sebesar 11,935 mg/L. Pengukuran amonia pada air sungai Ciwalen menghasilkan angka 10,213 mg/L. Nilai Pb berada pada kelas 3 dan 4 (0,03 – 0,5), sedangkan nilai Cu berada di bawah taraf mutu. Nilai Cr masih berada dalam rentang nilai baku mutu (0.05-1 mg/L). Nilai Zn tersebut kurang dari baku mutu (0,05 mg/L). Nilai Fe jauh lebih tinggi dari baku mutu (0,3 mg/L). Berdasarkan fakta pada Tabel 1, air sungai Ciwalen-Garut mempunyai rapor berwarna merah. Oleh karena itu, upaya nyata harus dilakukan untuk mengatasinya.

Untuk melakukan analisis bakteri dengan metode NGS 16s, harus disiapkan sampel DNA genom yang telah divalidasi sebagai DNA genom

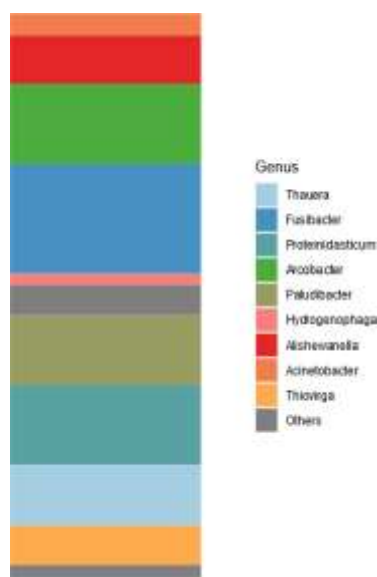
prokariotik. DNA genom prokariotik dikonfirmasi menggunakan pasangan primer 16s rRNA Primer 27F-M (27F-YM: 5'-AGAGTTGATYMTGGTCAG-3') dan Primer 1492R (5'-GGTACTTGTTACGACTT-3'), yang memperkuat gen RNA ribosom 1500 bp. Hasil konfirmasi PCR ini menunjukkan bahwa hasil isolasi DNA benar sebagai DNA genom prokariotik dengan pita DNA 1500 bp (Gambar 2).



Gambar 2. Visualisasi hasil konfirmasi PCR DNA genomik prokariot dengan primer 16s rRNA (line 1: sample; line 2: M (marker); line 3: (-) (kontrol negatif)

Metode *Next Generation Sequencing* (NGS) 16s rRNA dengan pasangan primer area V1 - V9 menghasilkan 104.000 bacaan, 150.232.539 basa, dan 81.761 spesies bakteri. *Fusibacter* > *Proteiniclasticum* > *Arcobacter* > *Paludibacter* > *Thauera* > *Aliswanella* > *Other* > *Thiovirga* > *Acinetobacter* > *Hydrogenophaga* merupakan 10 genera yang paling mendominasi (Gambar 3). Berdasarkan sepuluh genera yang paling banyak ditemukan, spesies bakteri yang paling dominan ditemukan adalah *Proteiniclasticum ruminis*, *Fusibacter ferrireducens*, *Fusibacter fontis*, *Fusibacter tunisiensis*, *Paludibacter propionicigenes*, *Arcobacter cloacae*, *Alishewanella jeotgali*, *Thiovirga sulfuroxydans*, *Pseudomonas fluvialis* & *Thauera mechernichensis*. Potensi masing-masing bakteri dalam siklus biokimia air sungai meliputi bakteri proteolitik *Proteiniclasticum ruminis* (Zhang *et al.*, 2009) pereduksi sulfur (*Fusibacter ferrireducens*, *Fusibacter fontis*, *Fusibacter tunisiensis*) (Fahdhlououi *et al.*, 2015).

Paludibacter propionigenes sebagai pereduksi nitrat (Ueki *et al.*, 2006), sebagai pereduksi sulfat trimetilamina oksida & tiosulfat *Alislawanella jeotgali* (Kim *et al.*, 2009), *Thauera meschernichensis* merupakan genus bakteri yang terlibat dalam penghilangan nitrat dan phosphor (Ren *et al.*, 2021) dan *Thiovirga sulfuroxydans* sebagai pengoksidasi belerang (Ito *et al.*, 2005).



Gambar 3. 10 genus paling dominan pada sampel air sungai Ciwalen-Garut.

Sedangkan *Arcobacter cloacae* merupakan bakteri berbahaya bagi manusia. Penelitian ini juga menemukan bakteri *Klebsiella pneumonia* yang dapat mendegradasi logam berat Cr, Pb dan Cd (Sanjay *et al.*, 2020; Henao & Herrera, 2021). Bakteri ini diketahui memiliki gen yang dapat mereduksi kromium (Sanjay *et al.*, 2020). Profil bakteri pada sampel air ini serta presentasi keberadaannya menunjukkan cukupnya keberadaan logam berat limbah penyamakan kulit di sungai Ciwalen. Dominasi jenis bakteri sebagai pereduksi sulfat tidak terlepas dari kondisi air sungai Ciwalen-Garut yang ditunjukkan dengan nilai BOD dan COD yang jauh lebih tinggi dari nilai ambang batas. Hal ini menunjukkan bahwa kandungan oksigen pada air sungai cukup rendah. Karena adanya molekul organik di sungai, bakteri pereduksi sulfat menghasilkan hidrogen sulfida (H_2S). Hidrogen sulfida ini kemudian akan terkumpul dalam sedimen dan naik ke permukaan air, dimana ia akan memakan oksigen terlarut. Keadaan ini turut menyebabkan terjadinya hipoksia di Sungai Ciwalen-Garut. Di sisi lain, mekanisme reduksi

sulfat ini sangat penting bagi siklus karbon dan sulfur di lingkungan (Muyzer *et al.*, 2008). *Fusibacter fontis* diisolasi sebagai bakteri gram positif anaerobik dari sampel mata air mesotermik di Tunisia oleh Fadhaloui *et al.* (2015). Bakteri ini terbukti mampu mereduksi unsur belerang. *Fusibacter ferrireducens* adalah bakteri gram positif anaerobik yang ditemukan di sedimen mangrove oleh Qiu *et al.* (2021). Nilai COD dan BOD yang sangat tinggi menyebabkan bakteri anaerob ditemukan lebih dominan. Bahan kimia kompleks dan karbohidrat menyediakan donor karbon dan elektron untuk bakteri ini. Hania *et al.* (2012) menemukan bakteri *Fusibacter tunisicensis* pada air limbah. Bakteri anaerob mesofilik ini mempunyai kemampuan menurunkan sulfat dan unsur sulfur. Bakteri *Paludibacter propionigenes* ditemukan di sawah di Jepang sebagai bakteri gram negatif, anaerobik yang dapat menurunkan nitrat, katalase, dan oksidase (Ueki *et al.*, 2006). *Pseudomonas fluvialis* adalah bakteri aerob gram negatif yang ditemukan oleh Sudan *et al.* (2018) dalam sampel sedimen dari Sungai Gangga di India. *Thauera mechernichensis* adalah bakteri dalam genus *Thauera*. *Thauera* terlibat dalam denitrifikasi autotrofik. Proses denitrifikasi autotrofik, yang memiliki kandungan nitrogen tinggi dan kandungan karbon rendah, merupakan alternatif dari denitrifikasi heterotrofik pada air limbah dan lindi TPA (Hashimoto *et al.*, 1987). Hal ini sesuai dengan kadar nitrogen total air sungai Ciwalen sebesar 11,935 mg/L. Nitrogen yang berlebihan dapat merusak ekosistem perairan dengan menimbulkan eutrofikasi dan penipisan oksigen terlarut, yang keduanya dapat menyebabkan kematian ikan dan makhluk laut lainnya (Ahmed dkk. 2022). Disisi lain bakteri dapat menggunakan kontaminan kimia sebagai sumber energi melalui proses metabolismenya. Hasil penelitian ini menunjukkan dominasi bakteri yang didukung oleh kondisi parameter fisik, biologi dan kimia (Ahrwar *et al.* 2016)

Kesimpulan

Hasil penelitian ini menunjukkan dominasi bakteri yang didukung oleh kondisi parameter fisik, biologi dan kimia. Karena adanya nilai COD dan BOD yang sangat tinggi, bakteri anaerob ditemukan lebih dominan. Temuan penelitian ini kedepannya dapat diperluas untuk mendapatkan isolat bakteri yang mempunyai kemampuan melakukan detoksifikasi logam berat.

Ucapan terima kasih

Penelitian ini didanai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia melalui skema Penelitian Dosen Pemula (PDP) tahun 2023.

Referensi

- Ahirwar, N.K., Gupta, G., Singh, R., Singh, V. (2016). Isolation, identification and characterization of heavy metal resistant bacteria from industrial affected soil in Central India. *Int. J. Pure. Appl. Biosci*, 4, 88–93
- Ahmed S.F., Kumar P.S., Kabir M., Zuhara F.T., Mehjabin A., Tasannum N., Hoang A.T., Kabir Z., Mofijur M. Threats. (2022). Challenges and Sustainable Conservation Strategies for Freshwater Biodiversity. *Environ. Res.* 214:113808. DOI: 10.1016/j.envres.2022.113808.
- Bahram M, Anslan S, Hildebrand F, Bork P, Tedersoo L. 2018. Newly designed 16S rRNA metabarcoding primers amplify divers and novel arhaeal taxa from the environment. *Environ. Microbiol. Rep.* 11(4): 487-494. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12684>.
- Chen, L., Liu, P., Evans, T. C. & Ettwiller, L. M. DNA damage is a pervasive cause of sequencing errors, directly confounding variant identification. *Science (80-.)*. 355, 752–756 (2017).
- de Coster W, D'Hert S, Schultz DT, Cruts M, van Broeckhoven C. 2018. NanoPack: visualizing and processing long-read sequencing data. *Bioinformatics* 34(15):2666-2669. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty149>.
- Fadhlaoui K., Hania W.B., Postec A., Fauque G., Hamdi M., Ollivier B. & M.L. Fardeau. (2015). *Fusibacter fontis* sp. nov., a sulfur-reducing, anaerobic bacterium isolated from a mesothermic Tunisian spring. *Int J Syst Evol Microbiol.* Volume 65(10):3501- 3506. DOI: 10.1099/ijsem.0.000445
- Hena S.G. & Herrera T.G. (2021). Heavy Metals in Soils and the Remediation Potential of Bacteria Associated With the *Plant Microbiome*. Volume 9 | Article 604216. DOI: 10.3389/fenvs.2021.604216
- Hania W.B., Fraj B., Postec A., Fadhlaoui K., Hamdi M., Ollivier B., M.L. Fardeau. (2012). *Fusibacter tunisiensis* sp. nov., isolated from an anaerobic reactor used to treat olive-mill wastewater. *Int J Syst Evol Microbiol.* Volume 62 (6). <https://doi.org/10.1099/ijms.0.034603-0>
- Hashimoto S., Furukawa K. & Shioyama M. (1987). Autotrophic denitrification using elemental sulfur. *Journal of Fermentation Technology*. Volume 6 (6), 683-692.
- Ito T., Sugita K., Yumoto I., Nodasaka Y., & Okabe S. (2005). *Thiovirga sulfuroxydans* gen. nov., sp. nov., a chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacterium isolated from a microaerobic waste-water biofilm. *Int J Syst Evol Microbiol* May;55(Pt 3):1059-1064. DOI: 10.1099/ijms.0.63467-0.
- Kim M-S., Roh W.S., Nam Y-D., Chang H-W., Kim K-H., Jung M-J., Choi J-H, Park., E.J. & Bae J.W. (2009). *Alishewanella jeotgali* sp. nov., isolated from traditional fermented food, and emended description of the genus *Alishewanella*. *Int J Syst Evol Microbiol.* Sep;59(Pt 9):2313-6. DOI: 10.1099/ijms.0.007260-0.
- Nygaard, A.B., Tunsjø, H.S., Meisal, R. and Charnock, C., 2020. A preliminary study on the potential of Nanopore MinION and Illumina MiSeq 16S rRNA gene sequencing to characterize building-dust microbiomes *Scientific Reports* 10.1: 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59771-0>.
- Priyanto (2006). Uji Toksisitas Air Limbah Penyamakan Kulit Menggunakan Metode Penghambatan. *J. Tek. Ling.* 7, 212–218
- Qiu D., X. Zeng. L. Zeng. G. Li & Z. Shao. (2021). *Fusibacter ferrireducens* sp. nov., an anaerobic, Fe(III)- and sulphur-reducing bacterium isolated from mangrove sediment. *Int J Syst Evol Microbiol.* Volume 71 (11) <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004952>
- Ren T., Chi Y., Wang Y., Shi X., Lin X. & Jin P. (2021). Diversified metabolism makes novel *Thauera* strain highly competitive in low carbon wastewater treatment. *Water research* 206, 117742
- Sabat A.J., Zanten E.V., Akkerboom V., Wisselink G., Slochteren K.V., de Boer R.F., Hendrik R., Friedrich A.W., Rossen. (2017). Targeted next-generation sequencing of the 16S-23S rRNA region for culture-independent bacterial

- identification- increased discrimination of closely related species. *Sci. Rep.* **7**
DOI:10.1038/s41598-017-03458-6
- Sanjay M.S., Sudarsanam D., Raj G.A. & Baskar K. (2020). Isolation and identification of chromium reducing bacteria from tannery effluent. *Journal of King Saud University - Science*. Volume 32 (1): 265 – 271
<https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.05.001>
- Sudan S.K., Pal D., Bisht B., Kumar N., Chaudhry V., Patil P., Sahni G., Mayilraj S. & Krishnamurthi S. (2018). *Pseudomonas fluvialis* sp. nov., a novel member of the genus *Pseudomonas* isolated from the river Ganges, India. *Int J Syst Evol Microbiol*, Volume 68(1):402-408. DOI: 10.1099/ijsem.0.002520
- Sulistinah, N. & Sunarko, B. (2020). Biodegradation of acetonitrile and benzonitrile by a newly isolated *Rhodococcus pyridionvorans* strain i-benzo from leather tanning waste. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* **572**,
- Ueki A., Akasaka H., Suzuki D. & K. Ueki. (2006). *Paludibacter propionicigenes* gen. nov., sp. nov., a novel strictly anaerobic, Gram-negative, propionate-producing bacterium isolated from plant residue in irrigated rice-field soil in Japan. *Int J Syst Evol Microbiol*. Volume 56 (1):39-44. Doi: 10.1099/ijms.0.63896-0
- Zhang K., Song L., & Dong X. (2010). *Proteiniclasticum ruminis* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic proteolytic bacterium isolated from yak rumen. *Int J. Syst Evol Microbiol*, 60(Pt 9):2221-2225. DOI: 10.1099/ijms.0.011759-0
- Peraturan Pemerintah (2001). Undang-Undang No. 82 Tahun 2001 tentang Pengelolaan Kualitas Air Dan Pengendalian Pencemaran Air, Jakarta.
- Peraturan Pemerintah No. 35 Tahun 1991 Tentang sungai.