

## Posisi Filogeni Molekuler Bakteri *Bacillus* sp yang Diisolasi dari Media Kultur Rotifer Berbasis Pakan Limbah Perikanan

(Molecular Phylogenetic Position of *Bacillus* sp Bacteria Isolated from Rotifer Culture Medium Based on Fisheries Waste Diet)

Stenly Wullur

Faculty of Fisheries and Marine Science, Sam Ratulangi University, Manado 95115, Indonesia

\*Author for correspondence, e-mail; [stenlywullur@unsrat.ac.id](mailto:stenlywullur@unsrat.ac.id)

### Abstract

This study aims to identify and determine the phylogenetic position of two bacterial isolates (F0031 and F0033), isolated from culture media of Rotifer *Brachionus plicatilis* sp. complex. Genomic DNA of the bacteria was extracted using Qiaprep Miniprep Kit and the 16S rRNA gene was amplified using primer pairs 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-ACCTTGTTACGACTT-3'). The sequences were analyzed using Geneious Prime ver. 2020 and bacterial identification was performed using the Basic Local Alignment Tool (BLAST) method. Phylogenetic analysis was conducted using MEGA X, where the phylogenetic tree was constructed using the Maximum Likelihood method, and evaluated using the Bootstrap method. Results of this study showed that both bacterial isolates (F0031 and F0033) belong to different genera, namely *Bacillus* (F0031) and *Mesobacillus* (F0033). Bacterial isolate F0031 had the closest similarity and was located at the same phylogenetic branch as *B. cereus*, while isolate F0033 was with *M. jeotgali*.

**Keywords:** phylogeny, molecular, bacteria, bacillus, mesobacillus, rotifera, diet.

### Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi dan menentukan posisi filogeni dua isolat bakteri (F0031 dan F0033) yang diisolasi dari media kultur rotifer *Brachionus plicatili* sp. complex. DNA genom dari isolat bakteri diekstrak menggunakan Kit Qiaprep Miniprep dan gen 16S rRNA diampifikasi menggunakan pasangan primer 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan 1492R (5'-ACCTTGTTACGACTT-3'). Hasil sekuens dianalisis menggunakan Sequence scanner ver. 2.0 dan analisis sekuens dilakukan menggunakan Geneious Prime ver. 2020. Identifikasi isolat bakteri dilakukan dengan metode BLAST (Basic Local Alignment Tools) dan analisis filogenetik dilakukan dengan menggunakan MEGA X, dimana konstruksi filogeni menggunakan metode Maximum Likelihood yang dievaluasi dengan metode Bootstrap.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kedua isolat bakteri (F0031 dan F0033) merupakan isolat bakteri yang berasal dari genus berbeda, yaitu genus *Bacillus* (F0031) dan genus *Mesobacillus* (F0033). Isolat bakteri F0031 memiliki kesamaan terdekat dan berada pada posisi percabangan filogenetik yang sama dengan *B. cereus* sedangkan Isolat F0033 dengan *M. jeotgali*

**Kata kunci:** Filogeni, molekuler, bakteri, bacillus, mesobacillus, rotifer, pakan

## PENDAHULUAN

Rotifer *Brachionus plicatilis* species complex merupakan salah satu jenis zooplankton yang banyak digunakan sebagai pakan alami dalam industri pembenihan larva berbagai jenis ikan laut (Hagiwara et al. 2014; Hagiwara et al. 2017; Kotani et al. 2017; Wullur 2017). Beberapa keunggulan rotifer sebagai pakan alami diantaranya adalah; ukuran tubuh yang kecil sehingga sesuai dengan bukaan mulut larva, laju reproduksi yang cepat sehingga memungkinkan dirproduksi

dalam waktu yang singkat, pertumbuhan populasi yang tinggi sehingga memungkinkan dipelihara dengan kepadatan populasi tinggi, motilitas yang relatif lambat sehingga mudah dimangsa larva, dapat dibudidaya secara massal sehingga dapat memenuhi kebutuhan biomasa larva ikan yang dipelihara, dan nilai nutrisi rotifer yang dapat dimanipulasi sesuai dengan sumber pakan yang diberikan (Wullur et al. 2011; Wullur et al. 2013; Hagiwara et al. 2014; Rumengan et al. 2016; Wati and Imanto 2018; Wullur et al. 2018; Lee et al. 2019). Prosedur yang

digunakan saat ini untuk memproduksi rotifer, umumnya menggunakan mikroalga sebagai sumber nutrisi rotifer (Hagiwara et al. 2017). Akan tetapi, biaya produksi mikroalga menjadi kendala dalam industri ini sehubungan dengan biaya investasi dan operasional kultur mikroalga yang sangat tinggi (Acien et al. 2017). Dalam upaya untuk menekan biaya produksi pakan untuk rotifer, beberapa fasilitas pembenihan mencoba menggunakan alternatif pakan untuk rotifer dari bahan ragi roti yang murah dari segi biaya (Hagiwara et al. 2014; Hagiwara et al. 2017), akan tetapi, nilai nutrisi dari ragi roti ternyata relatif rendah terutama untuk kandungan asam eicosapentaenoic (20:5 n-3) dan docosahexaenoic (22:6 n-3) yang esensial dibutuhkan untuk mendukung pertumbuhan larva ikan. Selain itu, kultur rotifer berbasis ragi roti sering tidak stabil dan bahkan terkadang gagal karena penurunan kualitas air budidaya yang cepat, sehingga kultur rotifer berbasis ragi roti menjadi kurang menarik bagi pembudidaya ikan (Hagiwara et al. 2014; Hagiwara et al. 2017; Ogello et al. 2018; Ogello et al. 2019; Wullur et al. 2019; Ogello et al. 2020). Pada akhir 1980-an, perusahaan industri Chlorella Jepang (Fukuoka, Jepang) telah mengembangkan pasta mikroalga Chlorella V-12® sebagai pakan untuk rotifer. Pasta mikroalga ini praktis karena sudah siap pakai dan dapat disimpan selama sekitar 2 minggu tanpa kehilangan nilai nutrisinya yang signifikan, serta memungkinkan pembudidaya melakukan kultur rotifer kepadatan tinggi (Hagiwara et al. 2014; Hagiwara et al. 2017) tetapi sayangnya, harga pakan pasta mikroalga Chlorella V-12® sangat mahal dan tidak umum tersedia di fasilitas-fasilitas pembenihan terutama di negara-negara berkembang termasuk di Indonesia (Hagiwara et al. 2014). Baru-baru ini, kami mengembangkan suatu prototipe produk pakan untuk rotifer dengan menggunakan bahan dasar dari limbah buangan industri perikanan yang murah dari segi biaya dan tersedia untuk digunakan kapan saja. Produk pakan berbasis limbah perikanan ini merupakan sumber nutrisi tinggi protein yang memfasilitasi tumbuh dan

berkembangnya bakteri-bakteri pengurai, yang selanjutnya lagi dimanfaatkan oleh rotifer sebagai sumber nutrisi untuk pertumbuhan dan perkembangan rotifer (Ogello dkk., 2018; Napitupulu dkk., 2019; Ogello dkk., 2019; Wullur dkk., 2019, 2020; Ogello dkk., 2020). Penerimaan rotifer terhadap produk pakan berbasis limbah perikanan ini sangat baik, dimana pertumbuhan populasi rotifer yang diberi pakan ini meningkat secara signifikan sekitar 2000 hingga 3000 ind./ml dalam waktu kurang lebih 3 hingga 5 hari budidaya (Wullur dkk., 2017), dan nilai nutrisi bagi larva ikan yang diberi pakan rotifer ini sebanding dengan rotifer yang diberi pakan pasta mikroalga (Ogello dkk., 2018; Ogello dkk., 2019; Wullur et al., 2019, 2020; Ogello dkk., 2020). Sejauh ini, spesies bakteri yang terlibat dalam proses penguraian produk pakan berbasis limbah perikanan ini belum banyak diketahui. Hasil penelitian Wullur et al., 2020, menunjukkan adanya keterlibatan beberapa spesies bakteri dalam proses penguraian produk pakan berbasis limbah perikanan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui posisi filogeni molekuler dari bakteri yang diisolasi dari media kultur rotifer yang berperan dalam proses penguraian pakan berbasis limbah perikanan, dan menjadi salah satu sumber nutrisi dalam pemeliharaan rotifer *B. plicatilis* sp. complex (Wullur et al., 2020). Konstruksi filogeni bakteri dalam penelitian ini, menggunakan gen subunit kecil ribosom 16S rRNA sebagai gen target dengan beberapa keunggulan, dimana gen 16S rRNA ini cenderung memiliki sekuen yang sama pada berbagai jenis bakteri sehingga informasi filogenetik yang diperoleh dapat diterapkan pada banyak jenis bakteri. Gen 16S rRNA juga memiliki variasi yang cukup besar pada tingkat yang sesuai dengan tingkat perbedaan antara spesies bakteri yang memungkinkan untuk membedakan antara spesies yang sangat mirip secara morfologi atau fisiologi. Selain itu, gen 16S rRNA memiliki ukuran yang relatif panjang yaitu sekitar 1.500 pasangan basa yang memungkinkan untuk menghasilkan cukup banyak informasi filogenetik dalam proses analisis. Secara fungsi, gen 16S rRNA

berfungsi untuk menyandi RNA ribosom, yang digunakan untuk sintesis protein, yang mana fungsi ini sangat penting untuk seluruh jenis organisme, sehingga gen ini jarang hilang atau dimodifikasi secara drastis selama evolusi. Database sekuens gen 16S rRNA banyak tersedia di basis data seperti GenBank yang memungkinkan untuk membandingkan sekuens gen 16S rRNA yang diperoleh dengan sekuens di database (Fuks dkk., 2018; Wantania dkk., 2019; Wondal dkk., 2019; Akihary dkk., 2020).

## METODE

Isolat bakteri dalam penelitian ini diperoleh dari kultur rotifer *B. plicatilis* sp. complex yang dipelihara menggunakan pakan berbasis penguraian bahan limbah buangan dari industri perikanan. Prosedur persiapan pakan diadaptasi dari Paten No. P00201609066. Kultur rotifer dilakukan dengan menggunakan air laut steril yang diencerkan (25 ppt) dan ditempatkan pada ruangan bersuhu antara 25-28°C. Isolasi bakteri didapatkan dengan mengambil 1 mL sampel air dari kultur rotifer (kepadatan rotifer sekitar 100 ind./ml) dan diencerkan secara bertahap (dari 10 hingga 1000 kali) dalam air laut steril, ditumbuhkan pada nutrisi agar 2% (NA) dan ditempatkan dalam inkubator selama 24-48 jam pada suhu 37°C untuk pengamatan koloni bakteri mengikuti Laboffe (2012). Koloni bakteri yang mencolok secara fenotipik diisolasi, dibiakkan selama 24-48 jam dan disentrifus pada kecepatan 14.000 rpm selama 5 menit. Identifikasi molekuler dilakukan dengan mengekstraksi DNA genomik isolat bakteri menggunakan Kit Qiaprep Miniprep (Qiagen, Hilden, Jerman). Gen 16S rRNA isolat bakteri diamplifikasi menggunakan pasangan primer PCR universal (Integrated DNA Technologies-IDT, Singapura) 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan 1492R (5'-ACCTTGTTACGACTT-3') (Fuks et al. 2018; Wantania et al. 2019; Wondal et al. 2019; Akihary et al. 2020). Reaksi amplifikasi dilakukan dalam volume total 25 µl, terdiri dari 5 µl 5x Hotfirepool, 17 µl ddH<sub>2</sub>O, 1 µl Primer 8F, 1 µl Primer 1492R, dan 1 µl sampel. Amplifikasi dilakukan

selama 35 siklus dalam Thermocycler Profesional (Biometra, Analytik Jena). Profil suhu untuk PCR adalah 95°C selama 6 menit (1 siklus), 95°C selama 30 detik, 52°C selama 30 detik, dan 72°C selama 30 detik (35 siklus), diikuti dengan 72°C selama 10 menit pada akhir siklus terakhir. Produk PCR dielektroforesis pada gel agarosa 1% kemudian divisualisasikan dengan pewarnaan bromida etidium untuk memeriksa keberhasilan amplifikasi PCR. Untuk sekuensing DNA, ampikon dan primer (forward dan reverse) dilakukan dengan menggunakan jasa sekuensing First-Base Co., Selangor, Malaysia. Kit sekuensing BigDye® Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, USA) digunakan untuk sekuensing DNA secara dua arah, dan dibaca menggunakan sekuenser DNA otomatis ABI PRISM® 377. Kualitas sekuens yang diperoleh dianalisis menggunakan Sequence Scanner version 2.0 Software yang dikembangkan oleh Applied Biosystem. Setelah dianalisis, sekuens tersebut dipotong, dirangkai, dan diedit secara manual menggunakan Geneious Prime version 2020 (Kearse et al., 2012), tersedia di <http://www.geneious.com>. Sekuens yang sudah diedit, selanjutnya dianalisis menggunakan Basic Local Alignment Tools (BLAST) di The National Center for Biotechnology Information (NCBI), yang dapat diakses di <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Analisis filogenetik dilakukan menggunakan MEGA X (Kumar et al., 2018), dimana penjejakan nukleotida dilakukan menggunakan Clustal W dengan pengeditan manual jika diperlukan. Posisi filogeni dikonstruksi menggunakan metode Maximum Likelihood (ML). Pohon filogeni dievaluasi menggunakan metode bootstrap.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Rotifer dilaporkan memanfaatkan mikroorganisme termasuk bakteri sebagai salah satu sumber nutrisi untuk menunjang pertumbuhan, perkembangan dan reproduksinya (Loo et al. 2016; Nevejan et al. 2018; Wullur et al. 2019, 2020). Dalam penelitian ini, kepadatan populasi rotifer

yang dikultur menggunakan pakan berbasis limbah perikanan adalah sekitar 100 ind./mL. Laporan sebelumnya menggunakan prosedur pemberian pakan yang sama, menunjukkan kepadatan populasi rotifer yang lebih tinggi lagi, yaitu sekitar 3000-5000 ind./mL (Ogello et al. 2018; Ogello et al. 2019; Wullur et al. 2019; Ogello et al. 2020).

Hasil sampling bakteri dari medium kultur rotifer didapat sebanyak 2 isolat bakteri yang teridentifikasi sebagai bakteri dari genus *Bacillus* (F0031) dan *Mesobacillus* (F0033). Kedua isolat bakteri tersebut menampakkan karakter morfologi yang berbeda, dimana isolat F0031 memiliki ukuran koloni yang besar dengan margin erosi, sedangkan F0033 berukuran lebih kecil dengan margin halus. Warna koloni kedua isolat adalah putih susu dengan elevasi umbonat. Hasil BLAST sekuens nukleotida gen 16S rRNA dari ke 2 isolat bakteri (F0031 dan F0033) pada situs GenBank (NCBI), menunjukkan kesamaan tertinggi pada species *Bacillus cereus* (F0031) dan *Mesobacillus jeotgali* (F0033). *B. cereus* dilaporkan memiliki pengaruh positif dimana keberadaan *B. cereus* dalam media kultur dilaporkan dapat meningkatkan produksi enzim pencernaan pada ikan kerapu (*Epinephelus lanceolatus* dan *E. fuscoguttatus*), menghambat pertumbuhan bakteri patogen (Divya et al. 2015; Murillo dan Villamil 2011). Dipihak yang sama, *M. jeotgali* yang adalah basonym dari *Bacillus jeotgali* (Patel and Gupta, 2020) merupakan bakteri probiotik yang diisolasi dari makanan laut fermentasi tradisional Korea (Jeotgal) dari organisme laut yang diasinkan, seperti: ikan, moluska, dan crustacean (Yao et al. 2019). Sejauh ini, belum ada laporan sebelumnya tentang keberadaan bakteri probiotik ini dalam budidaya rotifer, tetapi bakteri tersebut dilaporkan memiliki efek menguntungkan pada kelangsungan hidup dan perkembangan larva *Litopenaeus vannamei* (Xue et al. 2016).

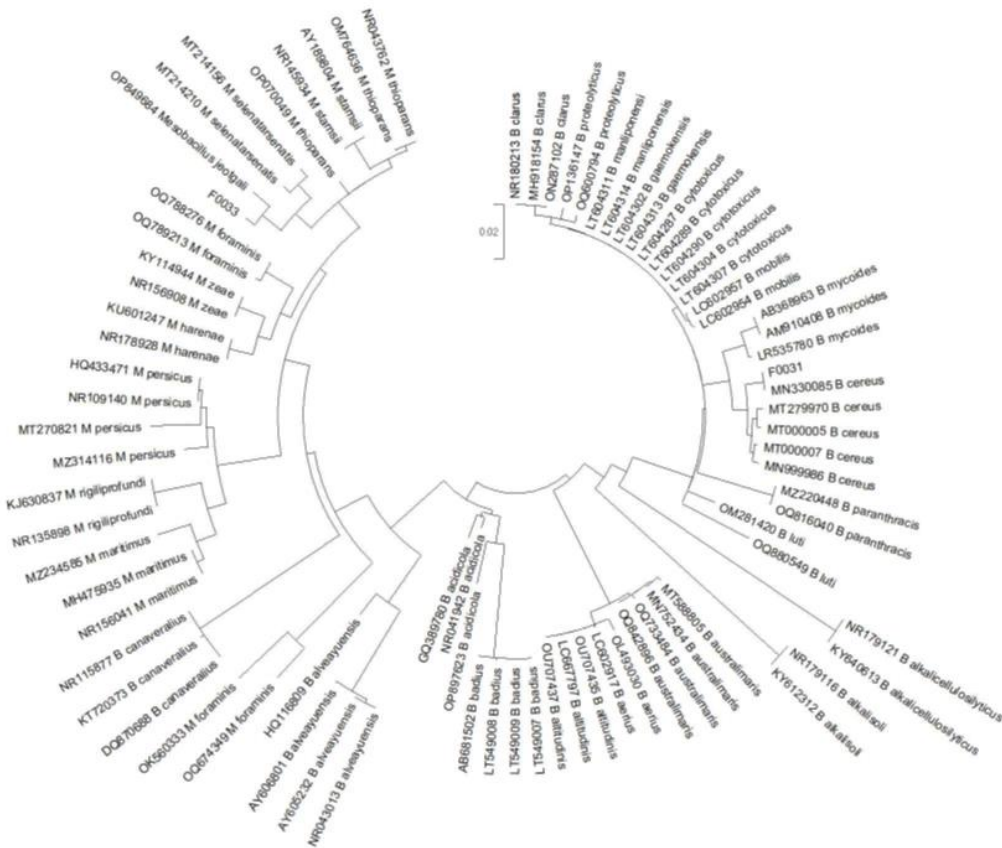
Hasil konstruksi posisi filogeni molekuler kedua isolat (F0031 dan F0033) dalam penelitian ini ditampilkan pada gambar 1. Posisi isolat F0031 dan F0033

berada pada kelompok percabangan berbeda dimana Isolat F0031 berada pada kelompok genus *Bacillus* sedangkan isolat F0033 berada pada kelompok genus *Mesobacillus*. Spesies bakteri yang tergabung dalam genus *Mesobacillus* pada awalnya merupakan kelompok species pada genus *Bacillus* namun setelah melalui analisis filogenetik dan kajian lanjut lainnya yang didasari pada perbedaan sifat-sifat fenotipik dan genotipik, seperti morfologi sel, suhu optimal pertumbuhan, dan analisis filogenetik berdasarkan 16S rRNA, maka kelompok species tersebut kemudian dikelompokkan kedalam genus *Mesobacillus*.

Spesies bakteri yang termasuk dalam kelompok genus *Bacillus* sebagaimana ditampilkan pada Gambar 1, diantaranya adalah; *B. clarus*, *B. proteolitycus*, *B. manliponensis*, *B. gaemokensis*, *B. cytotoxicus*, *B. mobilis*, *B. mycoides*, *B. cereus*, *B. paranthracis*, *B. luti*, *B. alkalicellulosilyticus*, *B. alkalisoli*, *B. australimalis*, *B. aerius*, *B. altitudinis*, *B. badius*, *B. acidicola*, *B. alveayuensis*, *B. foraminis* dan *B. canaveralius*. Sedangkan, spesies bakteri yang termasuk dalam kelompok genus *Mesobacillus* diantaranya adalah; *M. maritimus*, *M. rigliprofundii*, *M. persicus*, *M. harenae*, *M. zaeae*, *M. foraminis*, *M. jeotgali*, *M. selenatarsenatis*, *M. thioparans* dan *M. stansii*. Isolat F0031 berada pada kelompok percabangan yang sama dengan *B. cereus*, namun juga dengan *B. mycoides*. Secara filogenetik, *B. cereus* termasuk dalam kelompok *B. cereus* sensu lato, yang mencakup sejumlah spesies dan subspecies yang serupa secara morfologi dan fisiologis. Beberapa subspecies dari *B. cereus* sensu lato, seperti *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, dan *B. mycoides*, memiliki sifat yang berbeda dan seringkali dikelompokkan sebagai spesies yang sama. Isolat F0032 berada pada kelompok percabangan yang sama dengan *Mesobacillus jeotgali*, yang mana berada pula pada percabangan yang sama dengan *M. selenatarsenatis*, *M. thioparans* dan *M. stansii*. Meskipun spesies-spesies bakteri ini menunjukkan kesamaan dalam hal fisiologi dan genetik



namun spesies-spesies ini memiliki keunikan taksonomi yang berbeda.



Gambar 1. Posisi filogenetik isolat bakteri (F0031 dan F0032) yang diisolasi dari kultur medium Rotifer yang diberi pakan berbasis penguraian limbah perikanan. Konstruksi filogeni menggunakan metode Maximum Likelihood yang diuji menggunakan metode Bootstrap dan substitusi nukleotida menggunakan model Tamura Nei.

*B. cereus* dan *M. jeotgali* adalah bakteri yang memiliki potensi sebagai probiotik, yang perlu penelitian lebih lanjut untuk memastikan efektivitas dan keamanan penggunaannya sebagai bakteri probiotik. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa *B. cereus* dapat meningkatkan pertumbuhan dan kelangsungan hidup ikan dalam budidaya perikanan, serta memiliki aktivitas antimikroba terhadap beberapa patogen ikan (Khansari and Karimzadeh, 2012; Abedi and Feizi, 2014; Ouwehand et al., 2016). Sementara itu, *M. jeotgali* memiliki potensi sebagai probiotik dalam meningkatkan pertumbuhan dan kelangsungan hidup udang dalam budidaya perikanan (Ma et al., 2019). Seperti halnya dengan semua bakteri probiotik, penting untuk memastikan bahwa

penggunaan kedua isolat ini aman dan tidak menimbulkan risiko kesehatan atau lingkungan yang tidak diinginkan khususnya dalam pemanfaatannya sebagai inokulan bakteri pengurai pakan rotifer berbasis limbah perikanan.

## KESIMPULAN

Hasil penentuan posisi filogeni molekuler dua isolat bakteri yang diisolasi dari media kultur rotifer *B. plicatilis* sp. complex, yang dipelihara menggunakan pakan berbasis limbah perikanan, menunjukkan bahwa; Isolat bakteri F0031 dan F0033 merupakan isolat bakteri yang berasal dari genus berbeda, yaitu genus *Bacillus* (F0031) dan genus *Mesobacillus* (F0033). Isolat bakteri F0031 memiliki kesamaan terdekat dan berada pada posisi

percabangan filogenetik yang sama dengan *B. cereus*.

Isolat F0033 memiliki kesamaan terdekat dan berada pada posisi percabangan filogenetik yang sama dengan *M. jeotgali*.

### SARAN

Isolat bakteri *B. cereus* dan *M. jeotgali* dalam penelitian ini perlu melalui tahapan uji selanjutnya, diantaranya; uji toksisitas dan uji patogenitas untuk menjamin penggunaannya sebagai inokulan bakteri probiotik pengurai pakan rotifer berbasis penguraian limbah perikanan.

### DAFTAR PUSTAKA

- Abedi, D., & Feizi, H. (2014). Antibacterial activity of *Bacillus cereus* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) hatcheries against some fish pathogenic bacteria. *Journal of aquatic animal health*, 26(3), 175-181.
- Ación FG, Molina E, Fernández-Sevilla JM, Barbosa M, Gouveia L, Sepulveda C, Bazaes J, Arbib Z. 2017. Economics of microalgae production. In *Microalgae-based biofuels and bioproducts*. Woodhead Publishing, United Kingdom.
- Akihary CV, Kolondam BJ. 2020. Pemanfaatan gen 16s rRNA sebagai perangkat identifikasi bakteri untuk penelitian-penelitian di Indonesia. *Pharmakon* 9 (1): 16-22.
- Fuks G, Elgart M, Amir A, Zeisel A, Turnbaugh PJ, Soen Y, Shental N. 2018. Combining 16S rRNA gene variable regions enables high-resolution microbial community profiling. *Microbiome* 6 (1): 1-13.
- Hagiwara A, Kim HJ, Marcial H. 2017. Mass culture and preservation of *Brachionus plicatilis* sp. complex. In: Hagiwara A, Yoshonaga T (eds). *Rotifers Aquaculture, Ecology, Gerontology, and Ecotoxicology*. Springer, Singapore.
- Hagiwara A, Wullur S, Marcial HS, Hirai N, Sakakura Y. 2014. Euryhaline rotifer *Proales similis* as initial live food for rearing fish with small mouth. *Aquaculture* 432: 470-474.
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, et al. (2012). Geneious basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 28(12):1647–1649
- Khansari, A. R., & Karimzadeh, S. (2012). Study of *Bacillus cereus* as probiotic bacteria in the culture of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation*, 5(2), 89-95.
- Kotani T. 2017. The current status of the morphological classification of rotifer strain used in aquaculture. In: Hagiwara A, Yoshonaga T (eds). *Rotifers Aquaculture, Ecology, Gerontology, and Ecotoxicology*. Springer, Singapore.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6): 1547.
- Lee MC, Park JC, Yoon DS, Choi H, Shin KH, Kim HJ, Hagiwara A, Lee JS. 2019. Lipid metabolism modulation by five different food types in the monogonont marine rotifer *Brachionus koreanus*. *Aquaculture* 503: 596-601.
- Ma, Y., Li, X., Zhu, Y., & Li, J. (2019). Evaluation of the probiotic potential of *Mesobacillus jeotgali* P3B3 against pathogenic *Vibrio alginolyticus* in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and its effects on immune-related genes expression. *Fish & Shellfish Immunology*, 89, 411-417.
- Napitupulu, H. G., Rumengan, I. F. M., Wullur, S., Ginting, E. L., Rimper, J. R. T. S. L., & Toloh, B. H. (2019). *Bacillus* sp. As a Decomposition Agent in The Maintenance of *Brachionus rotundiformis* Which Uses Raw Fish As a Source of Nutrition. *Jurnal Ilmiah PLATAX*, 7(1), 158–169.

- <https://doi.org/10.35800/jip.7.1.2019.22627> [Indonesian].
- Ogello EO, Wullur S, Hagiwara A. 2019. Blending fishwastes and chicken manure extract as low-cost and stable diet for mass culture of freshwater zooplankton, optimized for aquaculture. IOP Conf Ser Mater Sci Eng 567: 012022. DOI: 10.1088/1757-899X/567/1/012022
- Ogello EO, Wullur S, Sakakura Y, Hagiwara A. 2018. Composting fishwastes as low-cost and stable diet for culturing *Brachionus rotundiformis* Tschugunoff (Rotifera): Influence on water quality and microbiota. *Aquaculture* 486: 232-239.
- Ogello EO, Wullur S, Yoshitaka S, Hagiwara A. 2020. Dietary value of waste-fed rotifer *Brachionus rotundiformis* on the larval rearing of japanese whiting *Sillago japonica*. E3S Web of Conferences. DOI: 10.1051/e3sconf/202014701005.
- Ouwehand, A. C., Ten Bruggencate, S. J. M., Schonewille, A. J., Alhoniemi, E., Forssten, S., & Salminen, S. (2016). Lactic acid bacteria supplements modified the intestinal microbiota and alleviated inflammation in a fish oil supplemented diet in mice. *Beneficial microbes*, 7(6), 853-863.
- Patel, S., & Gupta, R. S. (2020). A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*: Proposal for six new genera of *Bacillus* species, *Peribacillus* gen. nov., *Cytobacillus* gen. nov., *Mesobacillus* gen. nov., *Neobacillus* gen. nov., *Metabacillus* gen. nov. and *Alkalihalobacillus* gen. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(1), 406-438.
- Rumengan IFM, Sulung M, Lantiunga Z, Kekenusa J. 2016. Morfometri Rotifer *Brachionus rotundiformis* strain SS asal tambak Minanga dan tambak Watulney Sulawesi Utara yang dikultur pada salinitas yang berbeda. *Jurnal Riset Akuakultur* 2 (2): 221-229. [Indonesian]
- Wantania LL, Wullur S, Ginting EL, Mantiri DM, Undap SL, Sumilat DA, Gerung GS. 2019. Isolation and amplification of 16S rRNA gen of associated microbial isolates in red algae *Kappaphycus alvarezii* from Belang, Southeast Minahasa Regency, North Sulawesi. *Jurnal Ilmiah Platax* 7 (1): 220-226. [Indonesian]
- Wondal B, Ginting EL, Warouw V, Wullur S, Tilaar SO, Tilaar FF. 2019. Isolasi bakteri laut dari perairan Malalayang, Sulawesi Utara. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis* 7 (3): 183-189. [Indonesian]
- Wati M, Imanto PT. 2016. Kultur rotifer dengan beberapa jenis pakan dan kombinasinya. *Jurnal Riset Akuakultur* 4 (3): 349-356. [Indonesian]
- Wullur S, Ginting EL, Waraow V, Rumengan IFM, Ogello EO, Hagiwara A. 2019. Growth response of rotifers on a bacterial-based diet made from fishwastes. IOP Conf Ser Mater Sci Eng 567: 012030. DOI: 10.1088/1757-899X/567/1/012030.
- Wullur S, Kumagai S, Sakakura Y, Hagiwara A. 2018. Assessment of different minute zooplankton in the larval rearing of rusty angelfish *Centropyge ferrugata*. *AACL Bioflux* 11 (5): 1495-1501.
- Wullur S, Sakakura Y, Hagiwara A. 2011. Application of the minute monogonont rotifer *Proales similis* de Beauchamp in larval rearing of seven-band grouper *Epinephelus septemfasciatus*. *Aquaculture* 315 (3-4): 355-360.
- Wullur S, Yoshimatsu T, Tanaka H, Ohtani M, Sakakura Y, Kim HJ, Hagiwara A. 2013. Ingestion by Japanese eel *Anguilla japonica* larvae on various minute zooplanktons. *Aquac Sci* 61 (4): 341-347.
- Wullur S. 2017. Rotifer dalam Perspektif Marikultur. LPPM Press, Manado. [Indonesian]