

Optimasi Substrat Dan Pemilihan Co-Substrat Media Kultur Yang Sesuai Terhadap Pertumbuhan Dan Aktivitas Protease Ekstraseluler Bakteri *Bacillus Firmus* Dari Perairan Nusa Lembongan Bali, Indonesia

Muhammad Zainuddin^{1,2,3}, Delianis Pringgenies^{4,*}, Ocky Karna Radjasa^{4,5}, Haeruddin⁶, Aninditia Sabdaningsih¹, Vivi Ender Herawati⁷

¹Program Doktor Manajemen Sumber Daya Pantai, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro
Jl. Prof. H. Soedarto S.H, Tembalang, Semarang, Jawa Tengah 50275 Indonesia

²Marine Science Techno Park Universitas Diponegoro
Jl. UNDIP, Desa Teluk Awur, Tahunan, Telukawur, Jepara, Jawa Tengah 59427 Indonesia

³Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Sains dan Teknologi Unisnu Jepara
Jl. Taman Siswa, Pekeng, Tahunan Jepara, Jawa Tengah 59451 Indonesia

⁴Departemen Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro
Jl. Prof. H. Soedarto S.H, Tembalang, Semarang, Jawa Tengah 50275 Indonesia

⁵Badan Riset dan Inovasi Nasional Republik Indonesia
Jl. M.H. Thamrin No. 8, Jakarta Pusat 10340 Indonesia

⁶Departemen Manajemen Sumber Daya Pantai, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro

⁷Departemen Budidaya Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro
Jl. Prof. H. Soedarto S.H, Tembalang, Semarang, Jawa Tengah 50275 Indonesia

*Corresponding author e-mail: pringgenies@yahoo.com

ABSTRAK: Udang merupakan sumber protein hewani yang banyak diminati masyarakat karena citarasa enak dan bergizi. Udang merupakan komoditas perikanan ekspor. Upaya pemenuhan kebutuhan ekspor udang saat ini telah dilakukan budidaya intensif. Budidaya intensif telah terjadi pemberian pakan yang berlebih sehingga terbentuk limbah organik di dasar tambak. Limbah pakan mengakibatkan terbentuknya senyawa nitrit dan amoniak yang toksik bagi udang. Komponen utama limbah ini adalah protein. Protein harus di dekomposisi menjadi asam amino oleh bakteri proteolitik. Salah satu bakteri yang memiliki aktivitas proteolitik adalah bakteri *Bacillus Firmus* dari simbion sponge *Chalinula Pseudomolitba*. Tujuan penelitian adalah melakukan optimasi substrat dan pemilihan co-substrat media kultur yang sesuai terhadap pertumbuhan dan aktivitas protease ekstraseluler *Bacillus Firmus*. Penelitian menggunakan metode eksperimen laboratoris. Penelitian terdiri dari uji optimasi substrat, pemilihan Co-substrat C dan N. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri *Bacillus firmus* memiliki laju pertumbuhan dan aktivitas protease terbaik pada media kultur dengan substrat susu skim 1% dengan nilai 0,110 c/jam dan 12,566 c IU/ml. Sumber C terbaik adalah glukosa dengan nilai 0,124 c/jam dan 16,094 cIU/ml. Sumber N terbaik adalah amonium nitrat dengan nilai sebesar 0,137 c/jam dan 19,046 c IU/ml.

Kata Kunci: bakteri; simbion; sponge; pertumbuhan; protease

Substrate Optimization and Selection of Co-Substrate for Culture Media Appropriate to growth and activity of extracellular protease bacteria *Bacillus Firmus* From the waters of Nusa Lembongan Bali, Indonesia

ABSTRACT: Shrimp is a source of protein and have good taste. Shrimp is an export commodity. Shrimp cultivation is developing to be intensive. Intensive cultivation uses large amounts of feed. not all of the feed is eaten. leftover feed becomes waste. Feed waste produces nitrite and ammonia. Ammonia is toxic. Feed waste must be cleaned. Decomposition process by proteolytic bacteria. *Bacillus Firmus* is a proteolytic bacterium from the symbiont sponge *Chalinula Pseudomolitba*. The research aims to optimize the substrate and select the co-substrate. The study used a laboratory experimental method. The research consisted of a substrate optimization test, selection of Co-substrate C and N. The results showed that *Bacillus Firmus* had the best growth rate and protease activity on 1% skimmed milk substrate with values of 0.110 c/hour and 12,566 c IU/ml. The best

source of C is glucose with a value of 0.124 c/hour and 16,094 c IU/ml. The best source of N as ammonium nitrate with values of 0.137 c/hour and 19,046 c IU/ml.

Keywords: bacteria, symbionts, sponges, growth, proteases

PENDAHULUAN

Udang vannamei merupakan salah satu komoditas perikanan yang memiliki nilai ekspor yang tinggi. Pemenuhan kebutuhan ekspor udang vannamei telah dilakukan budidaya secara intensif. Budidaya udang secara intensif memiliki biaya pengeluaran yang besar dari sektor pakan. Pemberian pakan yang berlebihan dalam budidaya udang intensif telah menimbulkan permasalahan akumulasi sisa pakan di dasar tambak menjadi limbah organik. Limbah organik pakan ini dimanfaatkan oleh bakteri secara anaerob sebagai sumber karbon dan nitrogen pertumbuhan. Produk samping dari proses anaerob tersebut adalah senyawa amonia dan nitrit yang bersifat racun bagi udang (El-Saadony *et al.*, 2021). Limbah organik yang tinggi di perairan tambak akan menurunkan DO (dissolved oxygen) dan meningkatnya BOD (biological oxygen demand). Hal ini dapat mengganggu ketahanan udang, menurunkan laju pertumbuhan bahkan dapat menyebabkan laju kematian (Holt *et al.*, 2021).

Limbah organik pakan ini harus didekomposisi agar tidak merusak kualitas media budidaya udang. Proses dekomposisi dilakukan oleh bakteri penghasil enzim protease ekstraseluler. Salah satu bakteri yang memiliki aktivitas proteolitik tersebut adalah bakteri *Bacillus firmus*. Bakteri *Bacillus firmus* merupakan bakteri yang bersimbiosis dengan sponge *Chalinula pseudomolitba*. sponge *Chalinula pseudomolitba* hidup di perairan pantai dengan adanya Ekosistem Lamun. Sponge ini didapatkan di perairan Nusa Lembongan Bali – Indonesia. Bakteri *Bacillus firmus* memiliki potensi untuk dikembangkan menjadi produk probiotik secara komersil. Bakteri probiotik yang diaplikasikan pada media budidaya tambak udang dengan fungsi sebagai bioremediasi limbah organik pakan. Upaya mendapatkan biomassa bakteri yang cukup untuk aplikasi maka diperlukan teknologi kultur yang optimal. Peningkatan produksi biomassa sel memerlukan serangkaian optimasi dalam kultur, diantaranya penggunaan substrat dan co-substrat. Optimasi substrat media merupakan faktor penting yang mempengaruhi pertumbuhan dan biomassa sel bakteri (Zárate-Chaves *et al.*, 2013; Oh *et al.*, 2007). Nitrogen dalam media kultur sangat diperlukan untuk pertumbuhan sel, sedangkan unsur karbon media kultur digunakan untuk meningkatkan energi biosintesis (Rashmi and Gayathri, 2017). Penelitian ini memiliki tujuan mendapatkan kondisi substrat optimal dan pemilihan co-substrat yang tepat dalam kultur bakteri *Bacillus firmus* untuk meningkatkan pertumbuhan dan aktivitas produksi enzim protease ekstraseluler.

MATERI DAN METODE

Materi dalam penelitian ini adalah isolat bakteri *Bacillus firmus*. Bakteri *Bacillus firmus* yang bersimbiosis dengan sponge *Chalinula pseudomolitba*. Sponge *Chalinula pseudomolitba* yang didapatkan dari perairan pantai dengan adanya Ekosistem Lamun. Sponge ini didapatkan di perairan Nusa Lembongan Bali – Indonesia.

Peremajaan Isolat

Biakan murni stok dilakukan peremajaan pada media Nutrient Agar (NA). Sebanyak satu ose koloni digores dengan metode kuadran pada media Nutrient Agar (NA) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C (Pringgenies *et al.*, 2021; Wijaya *et al.*, 2021). Bakteri yang tumbuh siap untuk digunakan.

Preparasi Inokulum

Satu ose biakan miring diinokulasikan ke dalam 20 ml medium zobell 221E cair, kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Dilakukan scale up ke dalam medium zobell 221E cair

200 ml dalam erlenmeyer 500 ml, dan diinkubasi dengan suhu 30 °C dan diseker 150 rpm selama 24 jam (Ayuningtyas *et al.*, 2021; Pringgenies *et al.*, 2020).

Uji Optimasi Substrat

Optimasi konsentrasi substrat dilakukan pada kultur di media zobell 2216E broth yang diperkaya substrat susu skim dengan konsentrasi 1%, 3% dan 6%, ditambahkan inokulum 1% dengan OD 0,01 pada A600, pH 8, salinitas 30 ppt, dan inkubasi pada suhu ruang. Dilakukan inkubasi jam ke- 0, 2, 4, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, dan 48 dilakukan pengamatan terhadap pertumbuhan bakteri, aktivitas protease ekstraseluler dan kadar protein (Setyati *et al.*, 2015).

Pemilihan Ko-Substrat Sumber Karbon Dan Nitrogen

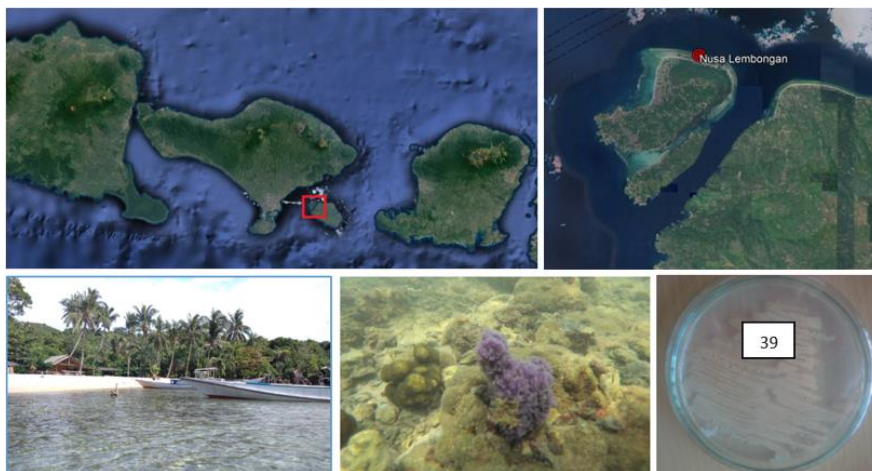
Sumber karbon yang diseleksi adalah glukosa, fruktosa dan molase sebanyak 1 % pada medium zobell 2216E. Sumber nitrogen yang diseleksi adalah amonium klorida, amonium nitrat, dan urea sebanyak 0,2% dalam medium zobell 2216E. Seleksi sumber karbon dan sumber nitrogen dilakukan kultur menggunakan erlenmeyer berkapasitas 1 liter dengan volume kerja 200 ml. Kondisi dari kultur yaitu media zobell 2216E broth diperkaya dengan susu skim konsentrasi optimum, konsentrasi inokulum 1% dengan OD 0,01 pada A600, pH8, salinitas 30 ppt, inkubasi pada suhu ruang. selanjutnya pada inkubasi jam ke- 0, 2, 4, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, dan 48 dilakukan pengamatan terhadap pertumbuhan bakteri, aktivitas protease ekstraseluler dan kadar protein (Jacek *et al.*, 2021; Stylianou *et al.*, 2021). Data pertumbuhan bakteri, aktivitas protease ekstraseluler dan kadar protein masing-masing perlakuan kemudian digunakan sebagai dasar melakukan seleksi sumber karbon dan nitrogen yang tepat untuk kultur.

Pengukuran Turbiditas Bakteri

Pengukuran pertumbuhan bakteri dilakukan dengan cara sebanyak 10 ml sampel disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Supernatan di buang dan natan yang didapatkan dilarutkan dengan larutan PBS sebanyak 10 ml lalu di divortex. Diamati nilai OD-nya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm (Setyati *et al.*, 2014). Data hasil pengukuran OD pada A600 kemudian di konversi dengan persamaan standart Mc Farland menjadi satuan sel/ml. nilai sel/ml tersebut digunakan untuk menghitung jumlah generasi (g), waktu generasi (Tg) dan laju pertumbuhan (μ) bakteri.

Pengukuran Aktivitas Enzim Protease Dan Kadar Protein

Substrat yang digunakan adalah kasein 1% dilarutkan ke dalam buffer fosfat (50 mM, pH 8). 1 ml substrat direaksikan dengan 1 ml sampel selama 10 menit pada suhu awal 37 °C. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1 ml trichloroacetic acid (TCA) 10% lalu inkubasi selama



Gambar 1. Lokasi sampling, sampel sponge dan isolat bakteri *Bacillus firmus*

10 menit pada suhu 37 °C. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit. Sebanyak 1 ml supernatan di tambahkan Na₂CO₃ 0,5 M dan pereaksi folin ciocalteus (1:2), campuran diinkubasi 30 menit pada suhu 37 °C. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 660 nm (Setyati *et al.*, 2015).

Data absorbansi protease konversi ke satuan mM dengan menggunakan persamaan kurva standar tirosin. Setelah di ketahui nilai mM selanjutnya dilakukan perhitungan AP (aktivitas protease) dengan satuan (IU/ml) dan T.AP (total protease) dengan satuan (IU). Kadar protein ditentukan dengan metode Bradford (1976) dengan menggunakan bovin serum albumin (BSA) sebagai protein standar pada kisaran 0.01-0.1 mg/mL dengan metode spektrofotometri pada panjang gelombang (λ) = 595 nm.

Data absorbansi protein digunakan untuk penentuan nilai KP (kadar protein) satuan (gram/ml) dengan menggunakan persamaan standart BSA. Dilakukan penentuan nilai TP (total protein) dengan satuan gram. Berdasarkan data aktivitas protease (U/ml) dan kadar protein (gram/ml) tersebut berikutnya dilakukan penghitungan AS (IU/mg).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimasi substrat dilakukan terhadap substrat susu skim dengan perlakuan perbedaan konsentrasi yaitu 1%, 3% dan 6%. Pengamatan yang dilakukan adalah pertumbuhan bakteri, aktivitas protease, kadar protein media dan aktivitas spesifik protease. Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan perbedaan konsentrasi substrat berpengaruh signifikan ($\alpha < 0,05$) terhadap pertumbuhan bakteri *Bacillus firmus*. Pengaruh perlakuan konsentrasi terhadap respon pola polynomial pertumbuhan bakteri dari yang terendah ke tertinggi secara berurutan adalah skim 6%, 3% dan 1%, dengan nilai kepadatan bakteri pada puncak polynomial sebesar 0,473; 1,025 dan 1,358 x 10⁸ sel/ml (Gambar 2). Perlakuan skim 1 % adalah yang terbaik terhadap pertumbuhan dengan pola polynomial $y = -0,0015x^2 + 0,0875x + 0,054$; $R^2 = 0,955$; $R = 0,977$.

Perlakuan skim 1%, 3% dan 6% tidak berpengaruh signifikan terhadap pertumbuhan mutlak bakteri yaitu dengan nilai 1,299 a, 0,948 a dan 0,415 a x 10⁸ sel/ml. Perlakuan skim 1%, 3% dan 6% berpengaruh signifikan terhadap laju pertumbuhan, jumlah generasi dan waktu generasi bakteri. Nilai laju pertumbuhan bakteri secara berurutan dari terendah ke tertinggi adalah skim 6%, 3% dan 1%, dengan nilai 0,076 a, 0,092 b dan 0,110 c. Nilai jumlah generasi secara berurutan dari terendah ke tertinggi adalah skim 6%, 3% dan 1%, dengan nilai 3,099 a, 3,727 b dan 4,454 c. Nilai waktu generasi secara berurutan dari terendah ke tertinggi adalah skim 1%, 3% dan 6% dengan nilai 6,322 a, 7,521 b dan 9,091 c.

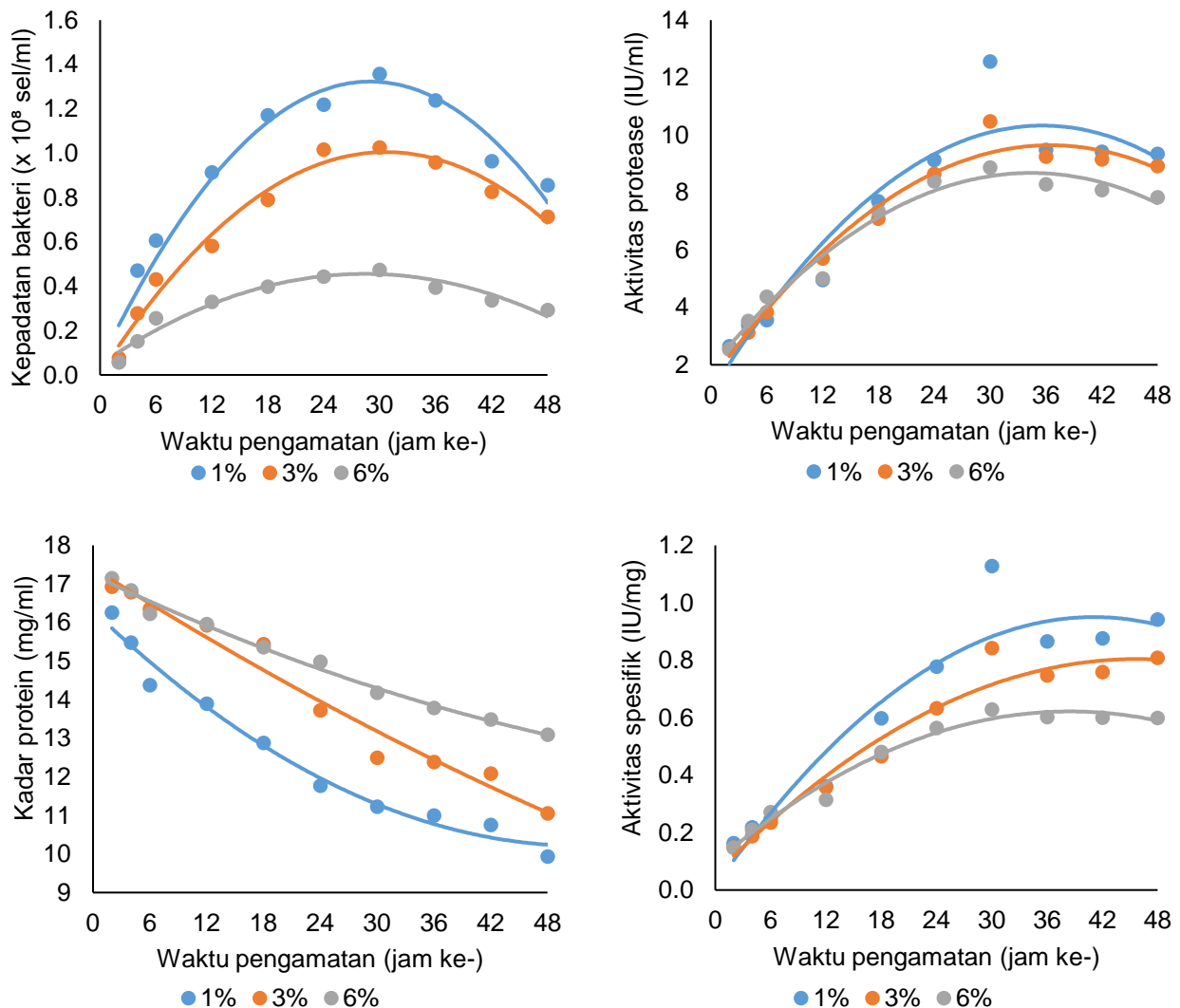
Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan perbedaan konsentrasi substrat berpengaruh signifikan ($\alpha < 0,05$) terhadap aktivitas protease, kadar protein dan aktivitas spesifik protease bakteri *Bacillus firmus*. Pengaruh perlakuan konsentrasi terhadap respon pola polynomial aktivitas protease bakteri dari yang terendah ke tertinggi secara berurutan adalah skim 6%, 3% dan 1%, dengan nilai aktivitas protease pada puncak polynomial sebesar 8,873 a, 10,482 b dan 12,566 c IU/ml. Perlakuan skim 1 % adalah yang terbaik terhadap aktivitas protease dengan pola polynomial $y = -0,0073x^2 + 0,5224x + 1,0258$; $R^2 = 0,905$; $R = 0,951$. Pengaruh perlakuan konsentrasi terhadap respon pola polynomial kadar protein bakteri dari yang terendah ke tertinggi secara berurutan adalah skim 1%, 3% dan 6%, dengan nilai kadar protein pada inkubasi jam ke- 30 sebesar 11,224 a, 12,492 ab dan 14,176 b mg/ml. Perlakuan skim 1 % adalah yang terbaik terhadap kadar protein dengan pola polynomial $y = 0,0023x^2 - 0,2358x + 16,314$; $R^2 = 0,980$; $R = 0,990$.

Pengaruh perlakuan konsentrasi terhadap respon pola polynomial aktivitas spesifik protease bakteri dari yang terendah ke tertinggi secara berurutan adalah skim 6%, 3% dan 1%, dengan nilai aktivitas spesifik protease pada puncak polynomial sebesar 0,627 a, 0,841 b dan 1,127 c IU/mg. Perlakuan skim 1 % adalah yang terbaik terhadap aktivitas spesifik protease dengan pola polynomial $y = -0,0006x^2 + 0,0455x + 0,0147$; $R^2 = 0,914$; $R = 0,956$. Berdasarkan penelitian perlakuan konsentrasi substrat maka dapat disimpulkan bahwa perlakuan skim 1% adalah yang terbaik dalam kultur bakteri *Bacillus firmus*.

Pemilihan ko-substrat sumber C dilakukan terhadap perbedaan jenis sumber C yaitu glukosa, fruktosa dan molase. Pengamatan yang dilakukan adalah pertumbuhan bakteri, aktivitas protease,

kadar protein media dan aktivitas spesifik protease. Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan perbedaan jenis sumber C berpengaruh signifikan ($\alpha < 0,05$) terhadap pertumbuhan bakteri *Bacillus firmus*. Pengaruh perlakuan perbedaan jenis sumber C terhadap respon pola polynomial pertumbuhan bakteri dari yang terendah ke tertinggi secara berurutan adalah molase, fruktosa dan glukosa dengan nilai kepadatan bakteri pada puncak polynomial sebesar $0,800$; $0,851$ dan $1,937 \times 10^8$ sel/ml. Perlakuan penambahan glukosa adalah yang terbaik terhadap pertumbuhan dengan pola polynomial $y = -0,0020x^2 + 0,121x - 0,17040$; $R^2 = 0,9210$; $R = 0,960$.

Perlakuan pemberian glukosa, fruktosa dan molase tidak berpengaruh signifikan terhadap pertumbuhan mutlak bakteri yaitu dengan nilai $1,877$ a, $0,793$ a dan $0,723$ a $\times 10^8$ sel/ml. Perlakuan perbedaan jenis sumber C berpengaruh signifikan terhadap laju pertumbuhan, jumlah generasi dan waktu generasi bakteri. Nilai laju pertumbuhan bakteri secara berurutan dari terendah ke tertinggi adalah molase, fruktosa dan glukosa dengan nilai $0,083$ a, $0,095$ b dan $0,124$ c. Nilai jumlah generasi secara berurutan dari terendah ke tertinggi adalah molase, fruktosa dan glukosa dengan nilai $3,374$ a, $3,856$ b dan $5,023$ c. Nilai waktu generasi secara berurutan dari terendah ke tertinggi adalah glukosa, fruktosa dan molase dengan nilai $5,602$ a, $7,268$ b dan $8,306$ c.



Gambar 2. Optimasi substrat terhadap Polynomial pertumbuhan, aktivitas proteasen kadar protein dan aktivitas spesifik protease bakteri *Bacillus firmus*

Tabel 1. Optimasi substrat terhadap pertumbuhan, aktivitas protease dan aktivitas spesifik

Konsentrasi	Pm (x 10 ⁸ sel/ml)	μ (jam ⁻¹)	g (generasi)	Tg (jam)	Aktivitas protease (IU/ml)	Kadar protein (mg/ml)	Aktivitas spesifik (IU/mg)
1%	1,299 a	0,110 c	4,454 c	6,322 a	12,566 c	11,224 a	1,127 c
3%	0,948 a	0,092 b	3,727 b	7,521 b	10,482 b	12,492 ab	0,841 b
6%	0,415 a	0,076 a	3,099 a	9,091 c	8,873 a	14,176 b	0,627 a

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan perbedaan jenis sumber C berpengaruh signifikan ($\alpha < 0,05$) terhadap aktivitas protease, kadar protein dan aktivitas spesifik protease bakteri *Bacillus firmus*. Pengaruh perlakuan perbedaan jenis sumber C terhadap respon pola polynomial aktivitas protease bakteri dari yang terendah ke tertinggi secara berurutan adalah fruktosa, molase dan glukosa dengan nilai aktivitas protease pada puncak polynomial sebesar 9,965 a, 12,432 b dan 16,094 c IU/ml. Perlakuan penambahan glukosa adalah yang terbaik terhadap aktivitas protease dengan pola polynomial $y = -0,0139x^2 + 0,8658x - 0,0523$; $R^2 = 0,8742$; $R = 0,935$. Pengaruh perlakuan perbedaan jenis sumber C terhadap respon pola polynomial kadar protein bakteri dari yang terendah ke tertinggi secara berurutan adalah glukosa, fruktosa dan molase dengan nilai kadar protein pada inkubasi jam ke- 30 sebesar 8,983 a, 11,260 b dan 10,332 b mg/ml. Perlakuan penambahan glukosa adalah yang terbaik terhadap kadar protein dengan pola polynomial $y = 0,0058x^2 - 0,4567x + 17,030$; $R^2 = 0,9346$; $R = 0,967$.

Pengaruh perlakuan perbedaan jenis sumber C terhadap respon pola polynomial aktivitas spesifik protease bakteri dari yang terendah ke tertinggi secara berurutan adalah fruktosa, molase dan glukosa dengan nilai aktivitas spesifik protease pada puncak polynomial sebesar 0,884 a, 1,205 b dan 1,798 c IU/mg. Perlakuan penambahan glukosa adalah yang terbaik terhadap aktivitas spesifik protease dengan pola polynomial $y = -0,0014x^2 + 0,0982x - 0,1806$; $R^2 = 0,8900$; $R = 0,943$. Berdasarkan penelitian perbedaan jenis sumber C maka dapat disimpulkan bahwa perlakuan penambahan glukosa adalah yang terbaik dalam kultur bakteri *Bacillus firmus*.

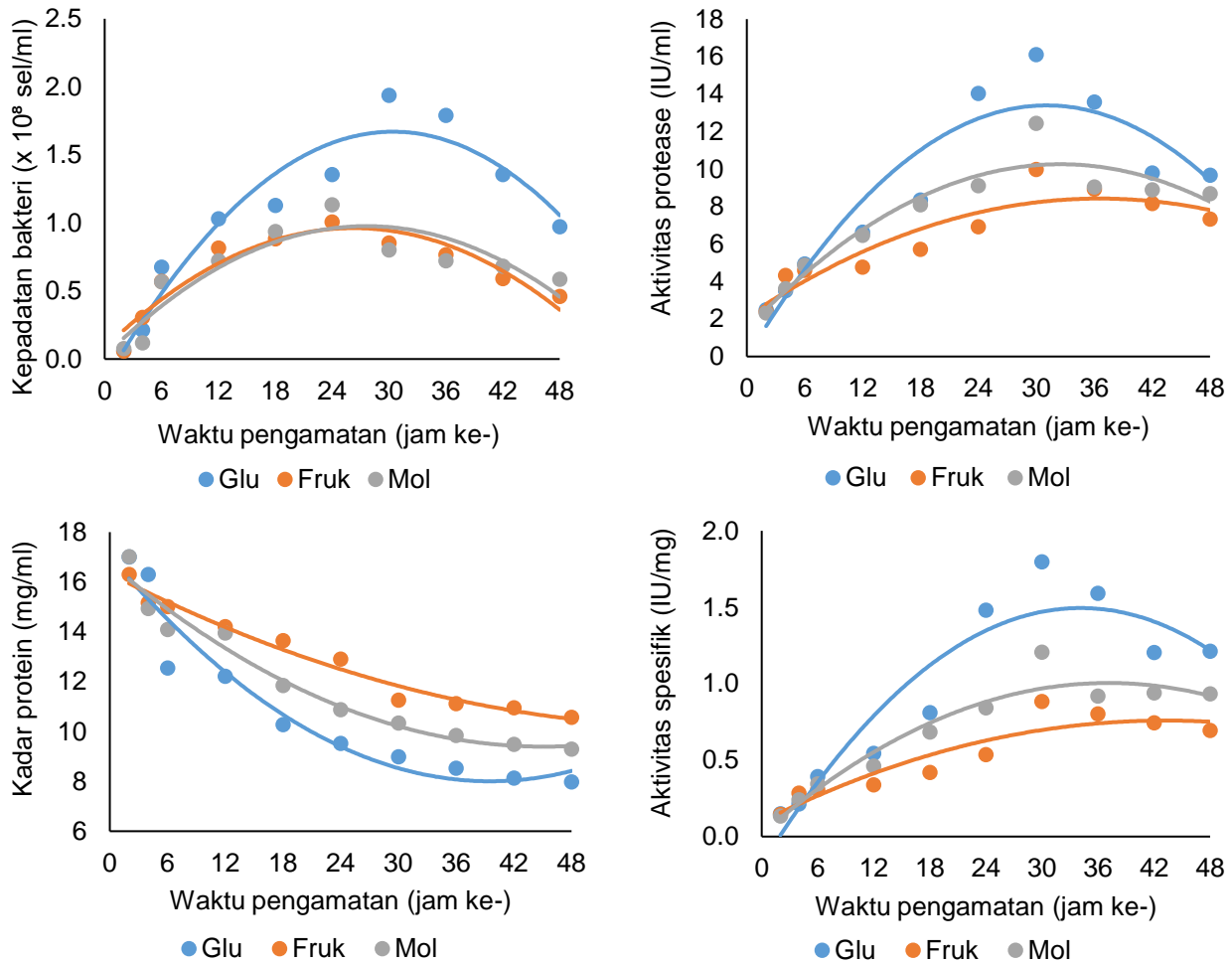
Hal ini dimungkinkan karena proses glikolisis, glukosa akan dirombak menjadi asam piruvat. Sedangkan fruktosa, harus dirombak menjadi glukosa terlebih dahulu kemudian baru masuk ke proses glikolisis. Begitu juga dengan molase, sehingga glukosa akan lebih baik dibandingkan yang lainnya. Sumber karbon yang berbeda-beda akan menghasilkan jumlah metabolit atau enzim yang berbeda pula (Prajapati *et al.*, 2022).

Beberapa dari spesies *Bacillus sp.*, seperti *Bacillus cereus* memanfaatkan glukosa, fruktosa, maltosa dan sukrosa untuk menghasilkan hidrogen dan produk asam. *Bacillus subtilis* tidak dapat menggunakan laktosa, galaktosa, dan xylose sebagai sumber karbon (Amin, 2018). Glukosa dipilih karena merupakan sumber karbon yang sederhana dan dapat digunakan oleh sebagian besar bakteri sebagai sumber karbon untuk pertumbuhan bakteri. Glukosa merupakan sumber karbon terbaik dari enam jenis karbon yang diujikan untuk mendegradasi fenol yaitu glukosa, galaktosa, maltose, xylose, fruktosa, dan sukrosa pada konsentrasi 0,5-2,5 g/L (Sathishkumar *et al.*, 2021)

Pemilihan ko-substrat sumber N dilakukan terhadap perbedaan jenis sumber N yaitu Amonium klorida, amonium nitrat dan urea. Pengamatan yang dilakukan adalah pertumbuhan bakteri, aktivitas protease, kadar protein media dan aktivitas spesifik protease. Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan perbedaan jenis sumber N berpengaruh signifikan ($\alpha < 0,05$) terhadap pertumbuhan bakteri *Bacillus firmus*.

Pengaruh perlakuan perbedaan jenis sumber N terhadap respon pola polynomial pertumbuhan bakteri dari yang terendah ke tertinggi secara berurutan adalah Amonium klorida, urea dan amonium nitrat dengan nilai kepadatan bakteri pada puncak polynomial sebesar 0,825, 1,773 dan $4,324 \times 10^8$ sel/ml. Perlakuan penambahan amonium nitrat adalah yang terbaik terhadap pertumbuhan dengan pola polynomial $y = -0,0049x^2 + 0,2944x - 0,7643$; $R^2 = 0,9039$; $R = 0,951$.

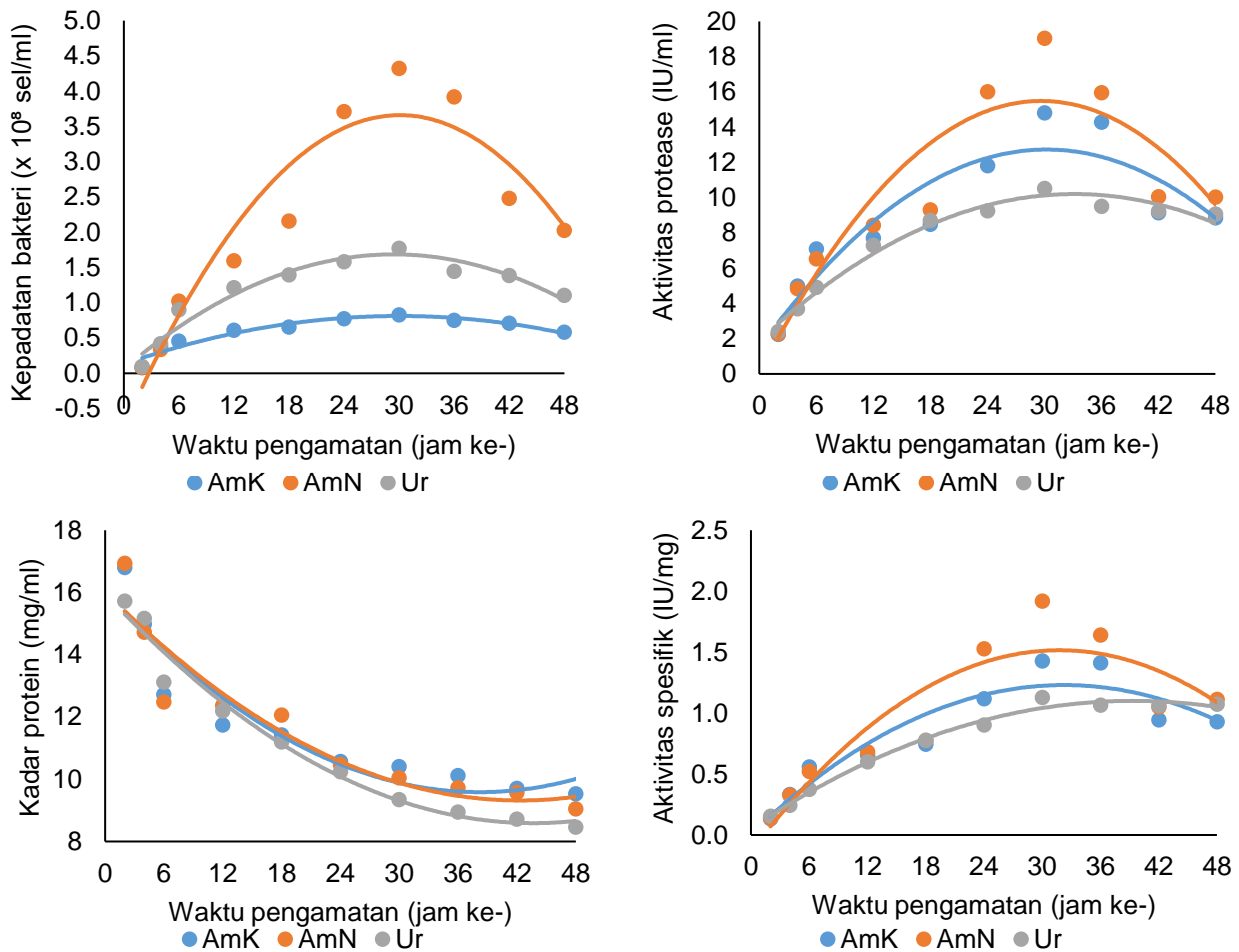
Perlakuan perbedaan jenis sumber N berpengaruh signifikan terhadap pertumbuhan mutlak, laju pertumbuhan, jumlah generasi dan waktu generasi bakteri. Nilai pertumbuhan mutlak bakteri secara berurutan dari terendah ke tertinggi adalah Amonium klorida, urea dan amonium nitrat dengan nilai 0,748 a, 1,676 b dan 4,242 b x 10⁸ sel/ml. Nilai laju pertumbuhan bakteri secara berurutan dari terendah ke tertinggi adalah Amonium klorida, urea dan amonium nitrat dengan nilai 0,085 a, 0,104 b dan 0,137 c. Nilai jumlah generasi secara berurutan dari terendah ke tertinggi adalah Amonium klorida, urea dan amonium nitrat dengan nilai 3,471 a, 4,203 b dan 5,572 c. Nilai waktu generasi secara berurutan dari terendah ke tertinggi adalah amonium nitrat, urea dan Amonium klorida dengan nilai 5,068 a, 6,666 b dan 8,124 c.



Gambar 3. Perbedaan sumber C terhadap Polynomial pertumbuhan, aktivitas proteasen kadar protein dan aktivitas spesifik protease bakteri *Bacillus firmus*

Tabel 2. Sumber C terhadap pertumbuhan, aktivitas protease dan aktivitas spesifik

Konsentrasi	Pm (x 10 ⁸ sel/ml)	μ (jam ⁻¹)	g (generasi)	Tg (jam)	Aktivitas protease (IU/ml)	Kadar protein (mg/ml)	Aktivitas spesifik (IU/mg)
Glukosa	1,877 a	0,124 c	5,023 c	5,602 a	16,094 c	8,983 a	1,798 c
Fruktosa	0,793 a	0,095 b	3,856 b	7,268 b	9,965 a	11,260 b	0,884 a
Molase	0,723 a	0,083 a	3,374 a	8,306 c	12,432 b	10,332 b	1,205 b



Gambar 4. Perbedaan sumber N terhadap Polynomial pertumbuhan, aktivitas proteasen kadar protein dan aktivitas spesifik protease bakteri *Bacillus firmus*

Tabel 3. Sumber N terhadap pertumbuhan, aktivitas protease dan aktivitas spesifik

Konsentrasi	Pm (x 10 ⁸ sel/ml)	μ (jam ⁻¹)	g (generasi)	Tg (jam)	Aktivitas protease (IU/ml)	Kadar protein (mg/ml)	Aktivitas spesifik (IU/mg)
Amonium Klorida	0,748 a	0,085 a	3,471 a	8,124 c	14,803 b	10,404 a	1,428 b
Amonium Nitrat	4,242 b	0,137 c	5,572 c	5,068 a	19,046 c	10,043 a	1,918 c
Urea	1,676 b	0,104 b	4,203 b	6,666 b	10,526 a	9,346 a	1,127 a

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan perbedaan jenis sumber N berpengaruh signifikan ($\alpha < 0,05$) terhadap aktivitas protease dan aktivitas spesifik protease bakteri *Bacillus firmus*. Pengaruh perlakuan perbedaan jenis sumber N terhadap respon pola polynomial aktivitas protease bakteri dari yang terendah ke tertinggi secara berurutan adalah urea, amonium klorida, dan amonium nitrat. Nilai aktivitas protease pada puncak polynomial sebesar 10,526 a, 14,803 b dan 19,046 c IU/ml. Perlakuan penambahan amonium nitrat adalah yang terbaik terhadap aktivitas protease dengan pola polynomial $y = -0,0175x^2 + 1,0394x + 0,0665$; $R^2 = 0,8366$; $R = 0,915$.

Pengaruh perlakuan perbedaan jenis sumber N terhadap respon pola polynomial kadar protein bakteri dari yang terendah ke tertinggi secara berurutan adalah urea, amonium nitrat, dan amonium klorida. Nilai kadar protein pada inkubasi jam ke- 30 sebesar 9,346 a, 10,043 a dan 10,404 a mg/ml.

Perlakuan penambahan amonium nitrat adalah yang terbaik terhadap kadar protein dengan pola polynomial $y = 0,0037x^2 - 0,3167x + 16,0150$; $R^2 = 0,8910$; $R = 0,944$.

Pengaruh perlakuan perbedaan jenis sumber N terhadap respon pola polynomial aktivitas spesifik protease bakteri dari yang terendah ke tertinggi secara berurutan adalah urea, amonium klorida, dan amonium nitrat. Nilai aktivitas spesifik protease pada puncak polynomial sebesar 1,127 a, 1,428 b dan 1,918 c IU/mg. Perlakuan penambahan amonium nitrat adalah yang terbaik terhadap aktivitas spesifik protease dengan pola polynomial $y = -0,0016x^2 + 0,1035x - 0,1302$; $R^2 = 0,8291$; $R = 0,911$. Berdasarkan penelitian perbedaan jenis sumber N maka dapat disimpulkan bahwa perlakuan penambahan amonium nitrat adalah yang terbaik dalam kultur bakteri *Bacillus firmus*.

Hal ini dimungkinkan karena gugus nitrat pada amonium nitrat merupakan sumber nutrisi untuk mikroorganisme. Sedangkan gugus klorida pada amonium klorida bukan merupakan sumber nutrisi untuk mikroorganisme, sehingga amonium klorida harus melakukan proses nitrifikasi terlebih dahulu untuk menghasilkan gugus nitrat sebagai sumber nutrisi, demikian pula dengan urea. Amonium nitrat ((NH)₄NO₄) merupakan sumber nitrogen anorganik yang diperlukan oleh *Bacillus* sp untuk meningkatkan aktifitas bakteri dalam medium produksi yang akan memberikan kecepatan eksponensial pertumbuhan sehingga meningkatkan produksi protease alkali. Sumber nitrogen digunakan mikroorganisme untuk mempercepat pertumbuhan sel dalam fermentasi (Jacek *et al.*, 2021).

Konsentrasi dan sumber nitrogen akan mempengaruhi nilai pH medium, pertumbuhan dan aktivitas mikroorganisme dalam proses fermentasi (Kohram *et al.*, 2021). Beberapa sumber nitrogen dan sumber karbon berlebih dapat menyebabkan penghambatan oleh substrat. Apabila dihubungkan dengan model monod dalam kondisi konsentrasi substrat rendah, penambahan konsentrasi substrat akan menambah laju pertumbuhan spesifik, namun pada batas tertentu konsentrasi substrat tidak berpengaruh nyata terhadap laju pertumbuhan spesifik, sehingga laju pertumbuhan sel konstan, dan dapat terjadi penghambatan oleh substrat itu sendiri (Zagrodnik *et al.*, 2021).

KESIMPULAN

Penelitian telah berhasil melakukan uji optimasi pertumbuhan dan aktivitas enzim protease ekstraseluler bakteri *Bacillus firmus* sibernon sponge *Chalinula pseudomolitba*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri *Bacillus firmus* memiliki laju pertumbuhan dan aktivitas protease terbaik pada kondisi kultur dengan substrat susu skim 1% dengan nilai 0,110 c dan 12,566 c IU/ml. Sumber C glukosa bernilai 0,124 c dan 16,094 c IU/ml. Sumber N amonium nitrat sebesar 0,137 c dan 19,046 c IU/ml.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada DIKTI yang telah memberikan beasiswa program doktor BPPDN dan dana penelitian sekema PDD. Peneliti mengucapkan terima kasih atas dukungan fasilitas penelitian dari Laboratorium Prodi Budidaya Perairan UNISNU Jepara, Laboratorium MSTP Undip Jepara, BBPBAP Jepara.

DAFTAR PUSTAKA

- Amin, M. 2018. Marine protease-producing bacterium and its potential use as an abalone probiont. *Aquaculture Reports*, 12:30–35. DOI: 10.1016/j.aqrep.2018.09.004.
- Ayuningtyas, E.P., Sibero, M.T., Hutapea, N.B., Frederick, E.H., Murwani, R., Zilda, D.S., Wijayanti, D.P., Sabdono, A., Pringgenies, D. & Radjasa, O.K. 2021. Screening of Extracellular Enzyme from Phaeophyceae-Associated Fungi. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 750(1):p.012005. DOI: 10.1088/1755-1315/750/1/012005.
- El-Saadony, M.T., Alagawany, M., Patra, A.K., Kar, I., Tiwari, R., Dawood, M.A., Dhama, K. & Abdel-Latif, H.M. 2021. The functionality of probiotics in aquaculture: An overview. *Fish and Shellfish Immunology*, 117:36–52. DOI: 10.1016/j.fsi.2021.07.007.

- Pringgenies, D., Girsang, P.H., Yudiati, E. & Santosa, G.W. 2020. Exploration of Sea Cucumber Intestinal Symbiont Microbe As Probiotic Microbe Candidate in Healthcare Products. *Journal of Fisheries and Marine Research*, 4(1):27–34. DOI: 10.21776/ub.jfmr.2020.004.01.4.
- Holt, C.C., Bass, D., Stentiford, G.D. & van der Giezen, M. 2021. Understanding the role of the shrimp gut microbiome in health and disease. *Journal of Invertebrate Pathology*, 186:1–14. DOI: 10.1016/j.jip.2020.107387.
- Jacek, P., da Silva, F.A.S., Dourado, F., Bielecki, S. and Gama, M., 2021. Optimization and characterization of bacterial nanocellulose produced by *Komagataeibacter rhaeticus* K3. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 2:p. 100022. DOI: 10.1016/j.carpta.2020.100022.
- Kohram, M., Vashistha, H., Leibler, S., Xue, B. & Salman, H. 2021. Bacterial Growth Control Mechanisms Inferred from Multivariate Statistical Analysis of Single-Cell Measurements. *Current Biology*, 31(5):955-964.e4. DOI: 10.1016/j.cub.2020.11.063.
- Oh, Y.J., Jo, W., Yang, Y. & Park, S. 2007. Influence of culture conditions on *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formation by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy*, 107:869–874. DOI: 10.1016/j.ultramic.2007.01.021.
- Prajapati, D., Bhatt, A. & Gupte, A. 2022. Production, optimization, partial-purification and pyrolysis kinetic studies of exopolysaccharide from a native brown-rot fungi *Fomitopsis meliae* AGDP-2. *Bioresource Technology Reports*, 17:p.100948. DOI: 10.1016/j.biteb.2022.100948.
- Pringgenies, D., Setyati, W.A., Djenaedi, A., Pramesti, R., Rudiyaniti, S. & Ariyanto, D. 2021. Exploration of antimicrobial potency of mangrove symbiont against multi-drug resistant bacteria. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, 13(2):222–232. DOI: 10.20473/jipk.v13i2.26199.
- Rashmi, B. & Gayathri, D. 2017. Evaluation and Optimization of Extracellular Digestive Enzymes from *Bacillus* spp. Isolated from Curds. *Maternal and Pediatric Nutrition*, 03:118. DOI: 10.4172/2472-1182.1000118.
- Sathishkumar, R., Kannan, R., Jinendiran, S., Sivakumar, N., Selvakumar, G. & Shyamkumar, R., 2021. Production and characterization of exopolysaccharide from the sponge-associated *Bacillus subtilis* MKU SERB2 and its in-vitro biological properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 166:1471–1479. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.11.026.
- Setyati, W.A., Martani, E., Triyanto, Subagiyo & Zainuddin, M. 2014. Selection, Identification and Optimization of the Growth Water Probiotic Consortium of Mangrove Ecosystems as Bioremediation and Biocontrol in Shrimp Ponds, *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 17(3):243–253. DOI: 10.17844/jphpi.v17i3.8913
- Setyati, W.A., Martani, E. & Zainuddin, M. 2015. Kinetika Pertumbuhan dan Aktivitas Protease Isolat 36k dari Sedimen Ekosistem Mangrove, Karimunjawa, Jepara. *Ilmu Kelautan: Indonesian Journal of Marine Sciences*, 20(3):163–169.
- Stylianou, E., Pateraki, C., Ladakis, D., Vlysidis, A. & Koutinas, A. 2021. Optimization of fermentation medium for succinic acid production using *Basfia succiniciproducens*. *Environmental Technology and Innovation*, 24:p101914. DOI: 10.1016/j.eti.2021.101914.
- Wijaya, P. A., Pringgenies, D. & Yudiati, E. 2021. Antibacteria Activity of Gastropod Association Bacteria From Mangrove Ecosystem Against *Bacillus Cereus* and *Escherichia Coli* and It'S Potency of Application for Belanak Fish (*Mugil Subviridis*). *Journal of Fisheries and Marine Research*, 5(1):15–21. DOI: 10.21776/ub.jfmr.2021.005.01.3.
- Zagrodnik, R., Duber, A. & Seifert, K. 2021. Hydrogen production during direct cellulose fermentation by mixed bacterial culture: The relationship between the key process parameters using response surface methodology. *Journal of Cleaner Production*, 314:p.127971. DOI: 10.1016/j.jclepro.2021.127971.
- Zárate-Chaves, C.A., Romero-Rodríguez, M.C., Niño-Arias, F.C., Robles-Camargo, J., Linares-Linares, M., Rodríguez-Bocanegra, M.X. & Gutiérrez-Rojas, I. 2013. Optimizing a culture medium for biomass and phenolic compounds production using *Ganoderma lucidum*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(1):215–223. DOI: 10.1590/S1517-8382201300500032.