

## Optimasi Kondisi Inkubasi Kultur (Suhu dan Agitasi) Terhadap Pertumbuhan dan Aktivitas Protease Ekstraseluler Bakteri *Bacillus firmus* Asosiasi Sponge (Porifera: Demospongiae) dari Nusa Lembongan Bali Indonesia

Muhammad Zainuddin<sup>1,2\*</sup>, Delianis Pringgenies<sup>3</sup>, Ocky Karna Radjasa<sup>4</sup>, Haeruddin<sup>5</sup>, Aninditia Sabdaningsih<sup>6</sup>, dan Vivi Endar Herawati<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Mahasiswa Program Doktor Manajemen Sumber Daya Pantai, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro

Jl. Prof. H. Soedarto S.H, Tembalang, Semarang, Jawa Tengah 50275 Indonesia

<sup>2</sup>Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Sains dan Teknologi Unisnu Jepara  
Jl. Taman Siswa No.9, Tahunan, Jepara, Jawa Tengah, Indonesia

<sup>3</sup>Departemen Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro  
Jl. Prof. H. Soedarto S.H, Tembalang, Semarang, Jawa Tengah 50275 Indonesia

<sup>4</sup>Badan Riset dan Inovasi Nasional, Indonesia

Jl. M.H. Thamrin No. 8, Jakarta Pusat 10340 Indonesia

<sup>5</sup>Departemen Manajemen Sumber Daya Pantai, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro

<sup>6</sup>Program Doktor Manajemen Sumber Daya Pantai, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro

<sup>7</sup>Departemen 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: zainudin@unisnu.ac.id

**ABSTRAK** : Perkembangan budidaya udang secara intensif, diikuti pula oleh permasalahan limbah organik sisa pakan. Salah satu cara untuk mengatasi permasalahan limbah organik adalah dengan bioremediasi menggunakan probiotik. Komponen utama limbah organik pakan ini adalah protein. Oleh sebab itu, konsorsium probiotik merupakan bakteri proteolitik. Bakteri *Bacillus firmus* yang bersimbiosis dengan sponge *Chalinula pseudomolitba* merupakan bakteri yang menghasilkan enzim protease ekstraseluler yang dapat menghidrolisis protein menjadi senyawa yang sederhana. Bakteri *Bacillus firmus* memiliki potensi untuk dijadikan probiotik. Diperlukan informasi tentang kondisi suhu dan agitasi inkubasi yang optimal untuk mendapatkan biomassa sel bakteri *Bacillus firmus* dalam pembentukan probiotik. Tujuan penelitian ini adalah melakukan uji optimasi suhu dan agitasi dalam inkubasi kultur terhadap pertumbuhan dan aktivitas protease ekstraseluler bakteri *Bacillus firmus*. Penelitian menggunakan metode eksperimen laboratoris. Penelitian telah berhasil melakukan uji optimasi suhu dan agitasi inkubasi kultur. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri *Bacillus firmus* memiliki laju pertumbuhan dan aktivitas protease terbaik pada kondisi kultur dengan suhu inkubasi 30 °C dengan nilai sebesar 0,194 c dan 34,660 d IU/ml. Selain itu juga memiliki laju pertumbuhan dan aktivitas protease terbaik pada kondisi agitasi inkubasi 150 rpm dengan nilai sebesar 0,124 b dan 40,039 b IU/ml.

**Kata Kunci**: bakteri; simbiosis; sponge; pertumbuhan; protease

### **Optimization of Culture Incubation Conditions (Temperature and Agitation) on the Growth and Activity of Extracellular Protease Bacteria *Bacillus Firmus* Association Sponge (Porifera: Demospongiae) From Nusa Lembongan Bali – Indonesia.**

**ABSTRACT** : The development of intensive shrimp farming is also followed by the problem of organic waste from feed residues. One way to overcome the problem of organic waste is bioremediation using probiotics. The main component of this feed organic waste is protein. Therefore, the probiotic consortium is a proteolytic bacteria. *Bacillus firmus* bacteria in symbiosis with *Chalinula pseudomolitba* sponge is a bacterium that produces extracellular protease enzymes that can hydrolyze proteins into simple compounds. *Bacillus firmus* bacteria have the potential to be used as probiotics. Information about optimal temperature conditions and incubation agitation is needed to obtain cell biomass of *Bacillus firmus* bacteria in the formation of probiotics. The purpose of this study was to test the optimization of temperature and agitation in culture incubation on the

growth and activity of extracellular proteases of *Bacillus firmus* bacteria. The study used a laboratory experimental method. Research has successfully carried out the optimization test of culture incubation temperature and agitation. The results showed that *Bacillus firmus* had the best growth rate and protease activity in culture conditions with an incubation temperature of 30 °C with values of 0.194 c and 34.660 d IU/ml. In addition, it also has the best growth rate and protease activity at 150 rpm agitated incubation conditions with values of 0.124 b and 40.039 b IU/ml.

**Keywords:** bacteria; symbionts; sponges; growth; proteases

## PENDAHULUAN

Pemberian pakan buatan ke dalam sistem budidaya intensif secara berlebihan telah menimbulkan terbentuknya limbah organik pada media air dan pengendapan pada dasar tambak. Limbah organik tersebut dapat menimbulkan kerusakan media tambak seperti meningkatnya kadar amoniak, terbentuknya senyawa H<sub>2</sub>S dan munculnya penyakit. Kerusakan kualitas lingkungan seperti ini menyebabkan udang rentan terhadap penyakit, sehingga menurunkan produktivitas tambak (El-Saadony *et al.*, 2021). Umumnya pengusaha tambak bergantung kepada pergantian air yang relatif tinggi untuk menjaga kualitas air pada sistem produksi, akibatnya terjadi pengeluaran material limbah pakan dan berbagai metabolit langsung ke lingkungan sekitar terdekat. Pencemaran lingkungan tambak dapat mengakibatkan kerusakan lingkungan dan ekologi.

Saat ini telah berkembang teknologi untuk mengatasi permasalahan pencemaran bahan organik tambak yaitu dengan cara pemanfaatan mikroba. Mikroba dengan aktivitas penghasil enzim ekstraseluler untuk mendegradasi limbah organik menjadi struktur sederhana (Bioremediasi). Sehingga lingkungan tambak menjadi terjaga kualitas dan kesehatannya (Holt *et al.*, 2021). Limbah organik sisa pakan memiliki komponen terbesar berupa protein. Oleh karena itu, di dalam konsorsium bakteri probiotik terdapat bakteri proteolitik. Salah satu bakteri proteolitik adalah bakteri *Bacillus firmus* yang bersimbiosis dengan sponge *Chalinula pseudomolitba*. Bakteri ini menghasilkan enzim protease ekstraseluler yang dapat menghidrolisis protein menjadi senyawa yang sederhana.

Bakteri *Bacillus firmus* memiliki potensi untuk dikembangkan menjadi konsorsium probiotik. Diperlukan teknologi kultur yang optimal guna mendapatkan biomassa sel *Bacillus firmus* yang tinggi untuk pembentukan probiotik. Optimasi kondisi inkubasi pada kultur yaitu parameter suhu dan agitasi merupakan hal yang penting untuk di ketahui. Optimasi kondisi kultur merupakan faktor penting yang mempengaruhi pertumbuhan dan biomassa sel bakteri (Zárate-Chaves *et al.*, 2013; Oh *et al.*, 2007). Agitasi dalam inkubasi kultur mempengaruhi pertumbuhan sel, sedangkan suhu inkubasi kultur mempengaruhi produksi enzim (Rashmi and Gayathri, 2017). Penelitian ini memiliki tujuan mendapatkan kondisi suhu dan agitasi optimal dalam inkubasi kultur bakteri *Bacillus firmus* untuk produksi biomassa bakteri.

## MATERI DAN METODE

Penelitian menggunakan materi isolat bakteri *Bacillus firmus* simbiosis sponge *Chalinula pseudomolitba* yang didapatkan dari perairan pantai dengan adanya ekosistem lamun di perairan Nusa Lembongan Bali – Indonesia. Bakteri *Bacillus firmus* memiliki morfologi berbentuk bulat sedang, permukaan kasar dan kering, sudut elevasi datar, tepian tidak rata dan berwarna putih pucat.

### Peremajaan dan Preparasi Inokulum

Peremajaan bakteri menggunakan media Nutrient Agar (NA). Dilakukan pengambilan isolat bakteri *Bacillus firmus* sebanyak satu ose dan di inokulasi dengan metode gores kuadran pada media NA. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C (Pringgenies *et al.*, 2021; Wijaya *et al.*, 2021). Bakteri yang tumbuh siap untuk digunakan.

Preparasi Inokulum dilakukan dengan mengambil satu ose koloni diinokulasikan ke medium zobell 221E cair volume 20 ml dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30 °C. Hasil inkubasi dilakukan scale up ke 200 ml medium zobell 221E cair dan diinkubasi selama 24 jam pada agitasi 150 rpm, suhu 30 °C (Ayuningtyas *et al.*, 2021; Girsang *et al.*, 2020).

### Optimasi Suhu

Medium zobell 2216E cair ditambah substrat susu skim dan ko-substrat dengan konsentrasi optimum, ditambahkan starter bakteri hingga memberikan OD 0,01 pada panjang gelombang 600 nm. pH dan salinitas media diatur pada pH 8 dan salinitas 30 ppt. Kultur diinkubasi pada variasi suhu 20°C, 25°C, 30°C, 35°C. Selama inkubasi dilakukan pengamatan terhadap pertumbuhan bakteri, aktivitas protease ekstraseluler dan kadar protein (Sriyapai *et al.*, 2022).

### Optimasi Agitasi

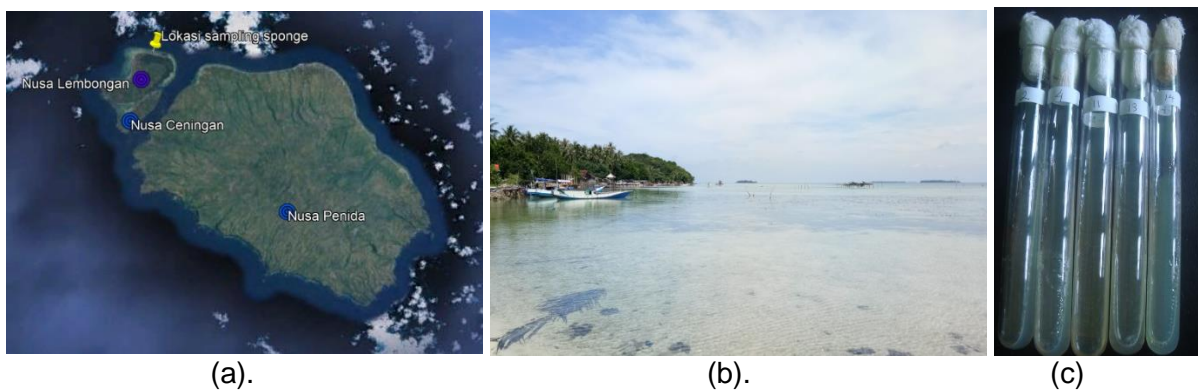
Medium zobell 2216E cair ditambah substrat susu skim, ko-substrat glukosa 0,5 %, Amonium nitrat 0,01 %, pH 8 dan salinitas 30 ppt. Media tersebut ditambahkan bakteri *Bacillus firmus* hingga memberikan OD 0,01 pada  $A_{600}$ . Kultur diletakkan dalam inkubator seker dengan suhu optimum dan pemberian perlakuan perbedaan agitasi 100 rpm dan 150 rpm. Selanjutnya pada inkubasi jam ke-0, 2, 4, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, dan 48 dilakukan pengamatan terhadap pertumbuhan, aktivitas protease dan kadar protein (Prajapati *et al.*, 2022).

### Pengukuran Pertumbuhan Bakteri

Pertumbuhan bakteri diukur dengan cara sebanyak 10 ml sampel disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Supernatan di buang dan natan yang didapatkan dilarutkan dengan 10 ml PBS. Selanjutnya diamati nilai OD-nya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm (Setyati *et al.*, 2014). Data hasil pengukuran OD pada  $A_{600}$  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 ( $\mu$ ) bakteri.

### Pengukuran Aktivitas Enzim Protease

Substrat yang digunakan adalah kasein 1% di dalam buffer fosfat (50 mM, pH 8). Sampel di tambahkan ke dalam substrat dengan perbandingan 1 : 1 (v/v) dan inkubasi 10 menit. Sebanyak 2 ml campuran di tambahkan 1 ml trichloroacetic acid (TCA) 10% lalu inkubasi selama 10 menit pada suhu 37 °C. Selanjutnya disentrifugasi 10.000 rpm selama 20 menit. Supernatan yang terbentuk di ambil 1 ml dan ditambahkan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,5 M sebanyak 2,5 ml dan folin ciocalteus sebanyak 0,5 ml, campuran diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit. Setelah inkubasi dilakukan spektrofotometri pada  $\lambda$  660 nm (Setyati *et al.*, 2015). Persamaan standar tirosin digunakan untuk konversi data OD menjadi mM. Selanjutnya mM untuk menentukan AP (aktivitas protease) dan T.AP (total protease).



**Gambar 1.** (a). Peta lokasi sampling, (b) Perairan lokasi sampling dan (c) Isolat *Bacillus firmus*

## Pengukuran Kadar Protein

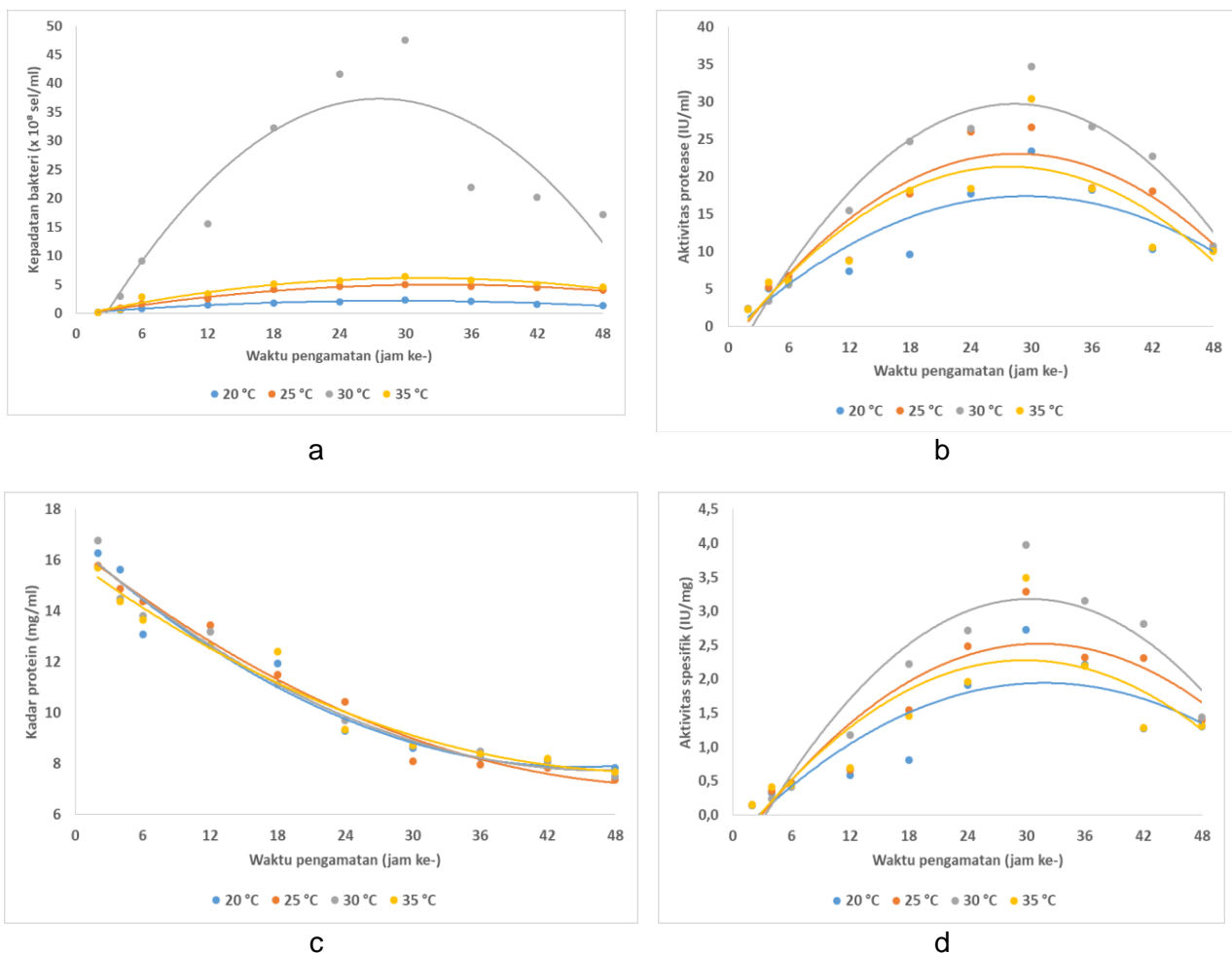
Kadar protein ditentukan dengan metode Bradford (1976). Sebanyak 1 ml sampel ditambah reagen Bradford 4 ml dan inkubasi 10 menit. Setelah inkubasi dilakukan penentuan nilai OD dengan spektrofotometer  $\lambda$  595 nm. Data OD dengan persamaan standart BSA digunakan untuk menentukan nilai KP (kadar protein) dan TP (total protein). Berdasarkan data aktivitas protease (U/ml) dan kadar protein (gram/ml) tersebut berikutnya dilakukan penghitungan AS (IU/mg).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

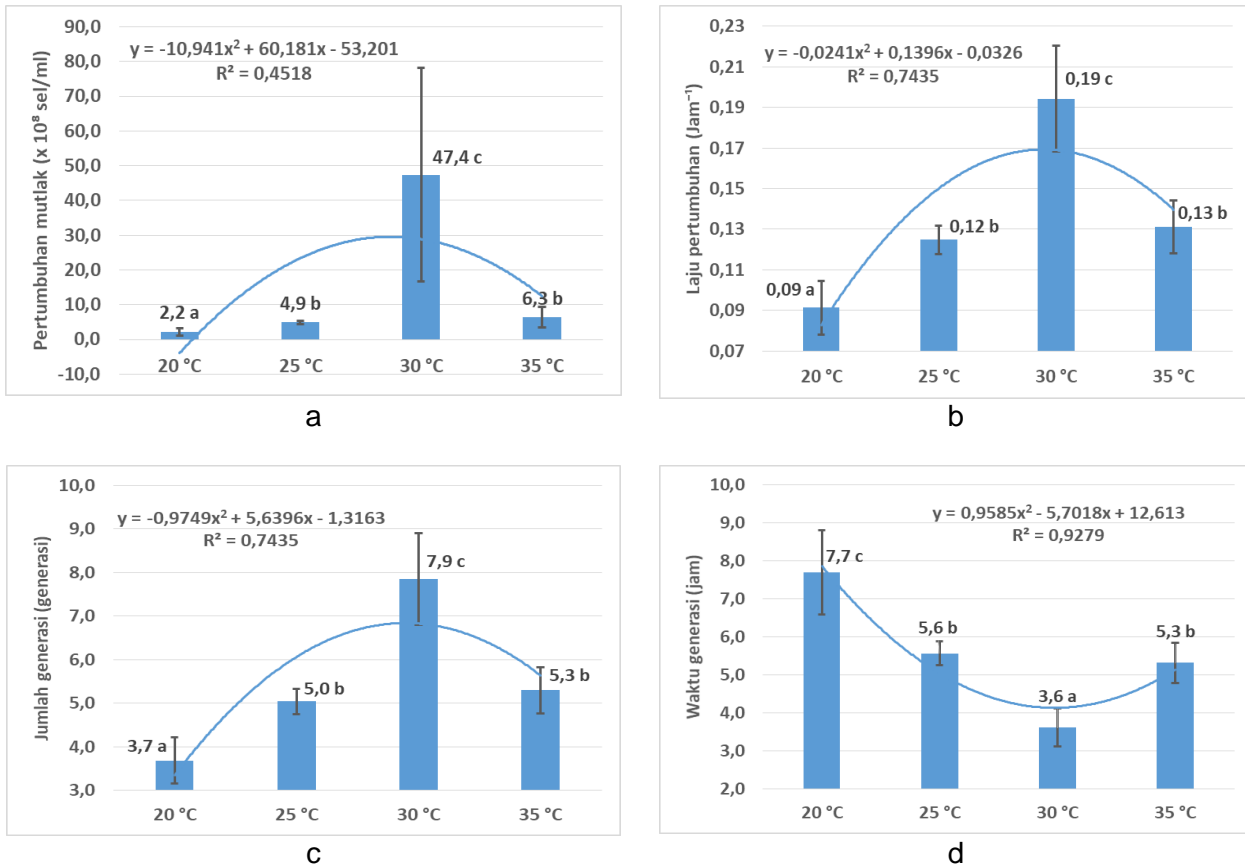
### Optimasi suhu

Optimasi suhu dilakukan terhadap perbedaan level yaitu 20, 25, 30 dan 35 °C. Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan optimasi suhu berpengaruh signifikan ( $\alpha < 0,05$ ) terhadap pertumbuhan bakteri *Bacillus firmus*.

Pengaruh perlakuan perbedaan suhu terhadap respon pola polynomial pertumbuhan bakteri dari yang terendah ke tertinggi secara berurutan adalah 20, 25, 35 dan 30 °C dengan nilai kepadatan bakteri pada puncak polynomial sebesar 2,388; 5,024; 6,442 dan 47,572 x 10<sup>8</sup> sel/ml. Perlakuan suhu 30 °C adalah yang terbaik terhadap pertumbuhan dengan pola polynomial  $y = -0,0603x^2 + 3,3349x - 8,7572$ ;  $R^2 = 0,8346$ ;  $R = 0,914$ .



**Gambar 2.** Optimasi suhu terhadap Polynomial (a) pertumbuhan, (b) aktivitas protease, (c) kadar protein dan (d) aktivitas spesifik protease bakteri *Bacillus firmus*



**Gambar 3.** Pengaruh perbedaan suhu terhadap (a) pertumbuhan mutlak, (b) laju pertumbuhan, (c) jumlah generasi dan (d) waktu generasi bakteri *Bacillus firmus*.

Perlakuan perbedaan suhu berpengaruh signifikan terhadap pertumbuhan mutlak, laju pertumbuhan, jumlah generasi dan waktu generasi bakteri. Nilai pertumbuhan mutlak bakteri secara berurutan dari terendah ke tertinggi adalah 20 °C, 25 °C, 35 °C dan 30 °C dengan nilai 2,214 a, 4,870 b, 6,287 b dan 47,398 c x 10<sup>8</sup> sel/ml. Nilai laju pertumbuhan bakteri secara berurutan dari terendah ke tertinggi adalah 20 °C, 25 °C, 35 °C dan 30 °C dengan nilai 0,091 a, 0,124 b, 0,131 b dan 0,194 c jam<sup>-1</sup>. Nilai jumlah generasi secara berurutan dari terendah ke tertinggi adalah 20 °C, 25 °C, 35 °C dan 30 °C dengan nilai 3,689 a, 5,041 b, 5,302 b dan 7,850 c. Nilai waktu generasi secara berurutan dari terendah ke tertinggi adalah 20 °C, 25 °C, 35 °C dan 30 °C dengan nilai 7,695 a, 5,566 b, 5,315 b dan 3,611 c jam.

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan perbedaan suhu berpengaruh signifikan ( $\alpha < 0,05$ ) terhadap aktivitas protease, kadar protein dan aktivitas spesifik protease bakteri *Bacillus firmus*. pengaruh perbedaan suhu terhadap respon pola polynomial aktivitas protease bakteri dari yang terendah ke tertinggi secara berurutan adalah 20 °C, 25 °C, 35 °C dan 30 °C dengan nilai aktivitas protease pada puncak polynomial sebesar 23,421 a, 26,591 b, 30,385 c dan 34,660 d IU/ml. Perlakuan suhu 30 °C adalah yang terbaik terhadap aktivitas protease dengan pola polynomial  $y = -0,0441x^2 + 2,5013x - 5,7357$ ;  $R^2 = 0,9491$ ;  $R = 0,974$ .

Pengaruh perbedaan suhu terhadap respon pola polynomial kadar protein bakteri dari yang terendah ke tertinggi secara berurutan adalah 25 °C, 20 °C, 35 °C dan 30 °C dengan nilai kadar protein pada inkubasi jam ke- 30 sebesar 8,098 a, 8,607 ab, 8,710 ab dan 8,718 b mg/ml. Perlakuan suhu 30 °C adalah yang terbaik terhadap kadar protein dengan pola polynomial  $y = 0,0040x^2 - 0,3777x + 16,613$ ;  $R^2 = 0,9755$ ;  $R = 0,988$ . Pengaruh perbedaan suhu terhadap respon pola polynomial aktivitas spesifik protease bakteri dari yang terendah ke tertinggi secara berurutan adalah

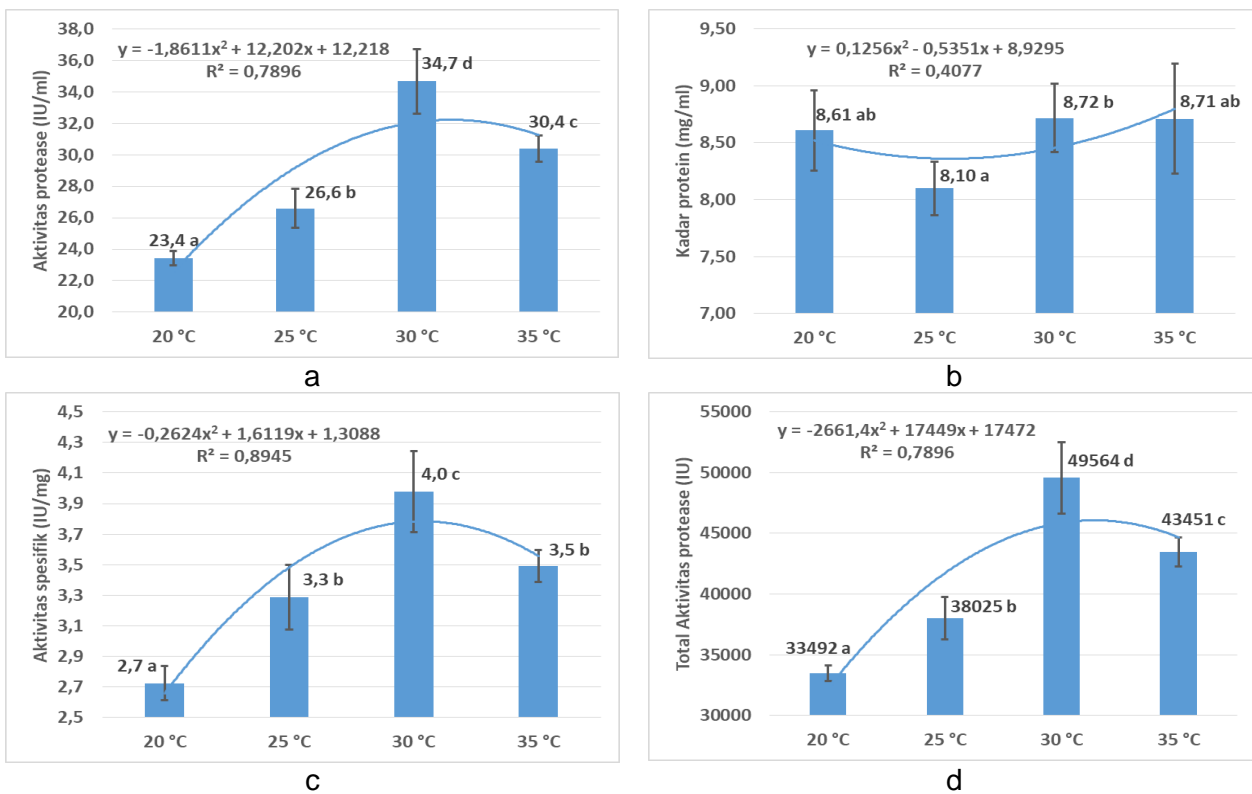
20 °C, 25 °C, 35 °C dan 30 °C dengan nilai aktivitas spesifik protease pada puncak polynomial sebesar 2,723 a, 3,286 b, 3,492 b dan 3,978 c IU/mg. perlakuan suhu 30 °C adalah yang terbaik terhadap aktivitas spesifik protease dengan pola polynomial  $y = -0,0043x^2 + 0,2639x - 0,8324$ ;  $R^2 = 0,9040$ ;  $R = 0,951$ . Berdasarkan penelitian perbedaan suhu maka dapat disimpulkan bahwa perlakuan suhu 30 °C adalah yang terbaik dalam kultur bakteri *Bacillus firmus*.

Paparan hasil optimasi suhu diatas menunjukkan bahwa masing-masing isolat memiliki laju pertumbuhan yang berbeda. Laju pertumbuhan bakteri tergantung dengan kondisi suhu. Apabila kondisi suhu sesuai, maka laju pertumbuhannya akan meningkat, sebaliknya apabila kondisi suhu tidak sesuai maka laju pertumbuhannya akan lambat. Pertumbuhan bakteri dapat diukur dengan penambahan berat sel. Karena berat sel relatif sama dengan siklus sel, maka pertumbuhan dapat didefinisikan sebagai penambahan jumlah sel (Zheng *et al.*, 2020).

**Optimasi Agitasi**

Optimasi agitasi dilakukan terhadap perbedaan level yaitu 100 dan 150 rpm. Hasil penelitian optimasi agitasi berpengaruh signifikan ( $\alpha < 0,05$ ) terhadap pertumbuhan *Bacillus firmus*. Pengaruh perlakuan perbedaan agitasi terhadap respon pola polynomial pertumbuhan bakteri dari yang terendah ke tertinggi secara berurutan adalah agitasi 100 dan 150 rpm dengan nilai kepadatan bakteri pada puncak polynomial sebesar 5,012 dan 101,016 x 10<sup>8</sup> sel/ml. Perlakuan agitasi 150 rpm adalah yang terbaik terhadap pertumbuhan dengan pola polynomial  $y = -0,1182x^2 + 7,3073x - 25,593$ ;  $R^2 = 0,9507$ ;  $R = 0,975$ .

Perlakuan perbedaan agitasi berpengaruh signifikan terhadap pertumbuhan mutlak, laju pertumbuhan, jumlah generasi dan waktu generasi bakteri. Nilai pertumbuhan mutlak bakteri secara berurutan dari terendah ke tertinggi adalah agitasi 100 dan 150 rpm dengan nilai 2,214 a dan 4,870 b x 10<sup>8</sup> sel/ml. Nilai laju pertumbuhan bakteri secara berurutan dari terendah ke tertinggi adalah



**Gambar 4.** Pengaruh perbedaan suhu terhadap (a) aktivitas protease, (b) kadar protein, (c) aktivitas spesifik dan (d) total aktivitas protease bakteri *Bacillus firmus*

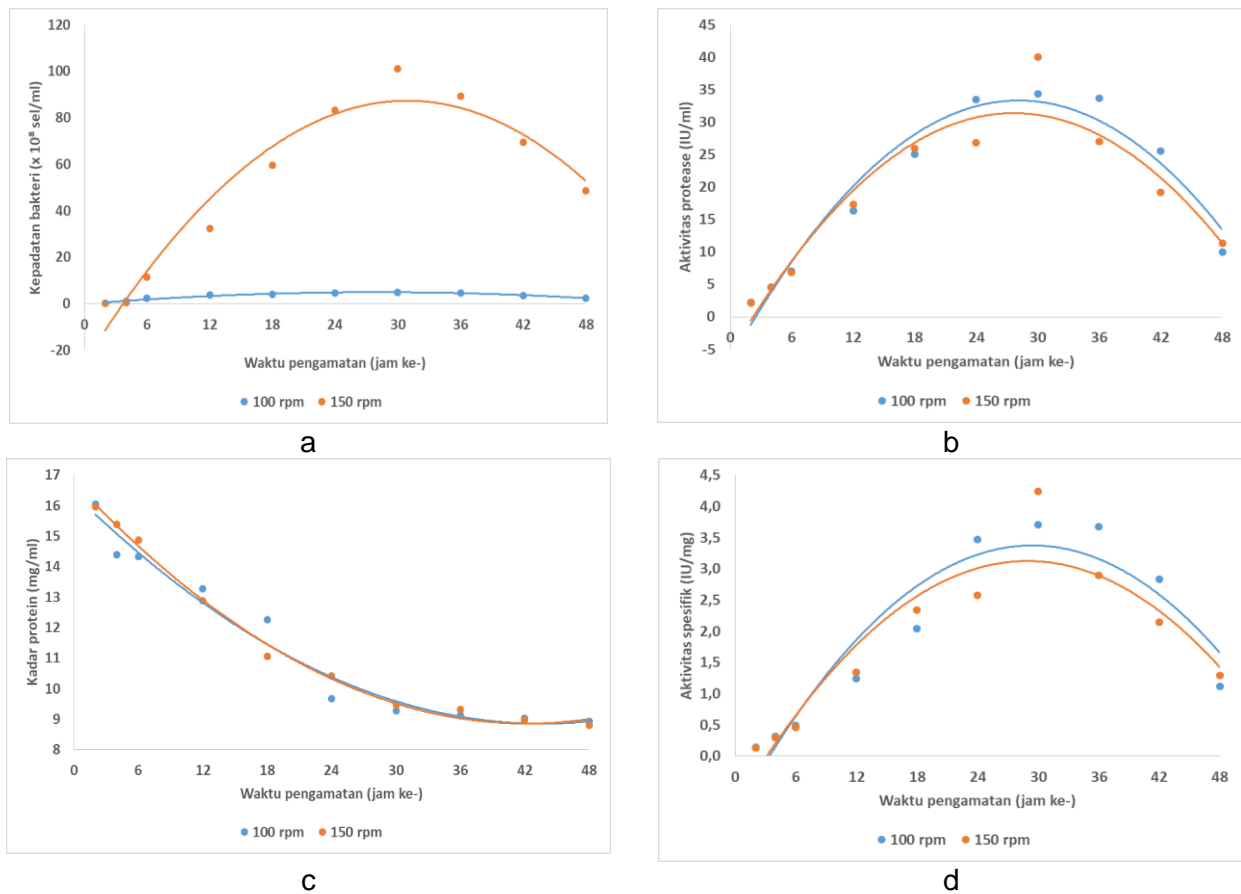


agitasi 100 dan 150 rpm dengan nilai 0,091 a dan 0,124 b. Nilai jumlah generasi secara berurutan dari terendah ke tertinggi adalah agitasi 100 dan 150 rpm dengan nilai 3,689 a dan 5,041 b. Nilai waktu generasi secara berurutan dari terendah ke tertinggi adalah agitasi 100 dan 150 rpm dengan nilai 7,695 a dan 5,566 b.

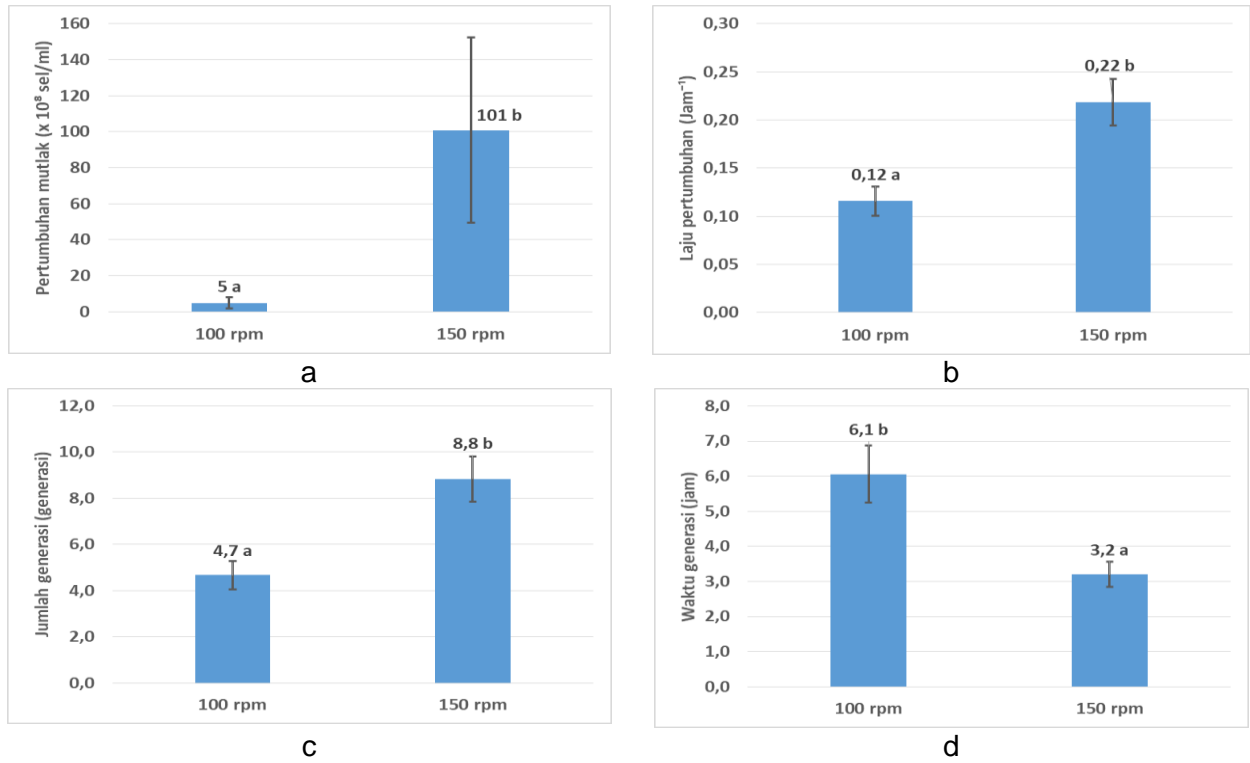
Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan perbedaan agitasi berpengaruh signifikan ( $\alpha < 0,05$ ) terhadap aktivitas protease dan aktivitas spesifik protease bakteri *Bacillus firmus*. Pengaruh perbedaan agitasi terhadap respon pola polynomial aktivitas protease bakteri dari yang terendah ke tertinggi secara berurutan adalah agitasi 100 dan 150 rpm dengan nilai aktivitas protease pada puncak polynomial sebesar 34,350 a dan 40,039 b IU/ml. Perlakuan agitasi 150 rpm adalah yang terbaik terhadap aktivitas protease dengan pola polynomial  $y = -0,0485x^2 + 2,6818x - 5,7228$ ;  $R^2 = 0,9106$ ;  $R = 0,954$ .

Pengaruh perbedaan agitasi terhadap respon pola polynomial kadar protein bakteri dari yang terendah ke tertinggi secara berurutan adalah agitasi 100 dan 150 rpm dengan nilai kadar protein pada inkubasi jam ke- 30 sebesar 9,274 a dan 9,457 a mg/ml. Perlakuan agitasi 150 rpm adalah yang terbaik terhadap kadar protein dengan pola polynomial  $y = 0,0044x^2 - 0,375x + 16,767$ ;  $R^2 = 0,9952$ ;  $R = 0,998$ .

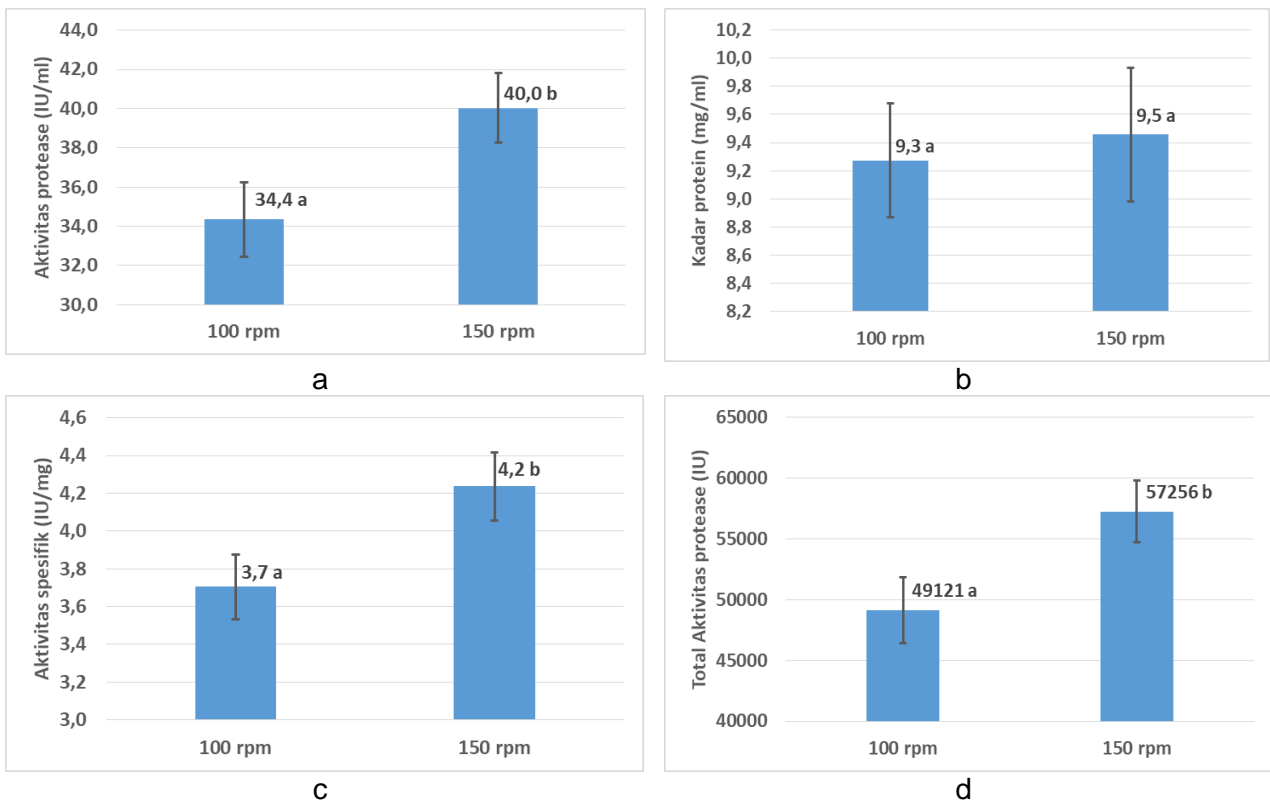
Pengaruh perbedaan agitasi terhadap respon pola polynomial aktivitas spesifik protease bakteri dari yang terendah ke tertinggi secara berurutan adalah agitasi 100 dan 150 rpm dengan nilai aktivitas spesifik protease pada puncak polynomial sebesar 3,705 a dan 4,237 b IU/mg. Perlakuan agitasi 150 rpm adalah yang terbaik terhadap aktivitas spesifik protease dengan pola polynomial  $y = -0,0047x^2 + 0,2711x - 0,7954$ ;  $R^2 = 0,8745$ ;  $R = 0,935$ . Berdasarkan penelitian perbedaan agitasi maka dapat disimpulkan bahwa perlakuan agitasi 150 rpm adalah yang terbaik



**Gambar 5.** Optimasi agitasi terhadap Polynomial (a) pertumbuhan, (b) aktivitas protease, (c) kadar protein dan (d) aktivitas spesifik protease bakteri *Bacillus firmus*.



**Gambar 6.** Pengaruh perbedaan agitasi terhadap (a) pertumbuhan mutlak, (b) laju pertumbuhan, (c) jumlah generasi dan (d) waktu generasi bakteri *Bacillus firmus*



**Gambar 4.** Pengaruh perbedaan pH terhadap (a) aktivitas protease, (b) kadar protein, (c) aktivitas spesifik dan (d) total aktivitas protease bakteri *Bacillus firmus*



dalam kultur bakteri *Bacillus firmus*. Protease adalah enzim yang mengkatalisasi pemecahan ikatan peptida dalam peptide, polipeptida dan protein dengan menggunakan reaksi hidrolisis menjadi molekul-molekul yang lebih sederhana seperti peptida rantai pendek dan asam amino. Aktivitas protease tiap isolat bakteri berbeda diduga karena dipengaruhi oleh jenis bakteri, lingkungan dan media. Pertumbuhan bakteri sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungan baik factor fisik, kimia dan biologi. Faktor fisika-kimia diantaranya suhu, pH, aerasi, agitasi dan komposisi media tumbuh. Sedangkan factor biologi adalah kompetisi dan kontaminasi (Rocchetti *et al.*, 2020)

## KESIMPULAN

Penelitian telah berhasil melakukan uji optimasi pertumbuhan dan aktivitas enzim protease ekstraseluler bakteri *Bacillus firmus* symbion sponge *Chalinula pseudomolitba*. Bakteri *Bacillus firmus* memiliki laju pertumbuhan dan aktivitas protease terbaik pada kondisi suhu inkubasi 30 °C sebesar 0,194 c dan 34,660 d IU/ml. serta pada agitasi inkubasi 150 rpm dengan nilai 0,124 b dan 40,039 b 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

- Ayuningtyas, E.P., Sibero, M.T., Hutapea, N.B., Frederick, E.H., Murwani, R., Zilda, D.S., Wijayanti, D.P., Sabdon, A., Pringgenies, D. & Radjasa, O.K. 2021. Screening of Extracellular Enzyme from Phaeophyceae-Associated Fungi *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 750(012005):1–10. 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(107387): 1–14. DOI: 10.1016/j.jip.2020.107387.
- 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., Djunaedi, 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):1-6 DOI: 10.4172/2472-1182.1000118.
- Rocchetti, G., Alcántara, C., Bäuerl, C., García-Pérez, J.V., Lorenzo, J.M., Lucini, L., Collado, M.C. & Barba, F.J. 2020. Bacterial growth and biological properties of *Cymbopogon schoenanthus* and *Ziziphus lotus* are modulated by extraction conditions. *Food Research International*, 136:

- 1–10. DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109534.
- Setyati, W.A., Martani, E., Triyanto, Subagiyo, Zainuddin, M. 2014. Consortium of Mangrove Ecosystems as Bioremediation and Biocontrol in Shrimp Ponds. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 17(3):243–253.
- 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.
- Sriyapai, T., Chuarung, T., Kimbara, K., Samosorn, S. & Sriyapai, P. 2022. Production and optimization of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from *Paraburkholderia* sp. PFN 29 under submerged fermentation, *Electronic Journal of Biotechnology*, 56:1–11. DOI: 10.1016/j.ejbt.2021.12.003.
- 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.
- 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/S1517-83822013005000032.
- Zheng, L., Yu, X., Wei, C., Qiu, L., Yu, C., Xing, Q., Fan, Y. & Deng, Z. 2020. Production and characterization of a novel alkaline protease from a newly isolated *Neurospora crassa* through solid-state fermentation. *Lwt*, 122:p. 108990. DOI: 10.1016/j.lwt.2019.108990.