

**OPTIMASI CO-SUBSTRAT GLUKOSA DAN AMONIUM NITRAT  
SEBAGAI SUMBER C/N MEDIA KULTUR TERHADAP PERTUMBUHAN  
DAN AKTIVITAS PROTEASE EKTRASELULER BAKTERI *Bacillus  
firmus* SIMBION SPONGE *Chalinula pseudomolitba***

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

- 1) Mahasiswa Program Doktor Manajemen Sumber Daya Perairan, FPIK -  
UNDIP Semarang  
2) Program Studi Budidaya Perairan, FST - UNISNU Jepara  
3) Departemen Ilmu Kelautan, FPIK – UNDIP Semarang  
4) Badan Riset dan Inovasi Nasional, Indonesia  
5) Departemen Manajemen Sumber Daya Perairan, FPIK – UNDIP  
Semarang  
6) Program Doktor Manajemen Sumber Daya Perairan, FPIK – UNDIP  
Semarang  
7) Departemen Budidaya Perikanan, FPIK – UNDIP Semarang  
Email: [zainudin@unisnu.ac.id](mailto:zainudin@unisnu.ac.id)

Received: 2 Maret 2022, Accepted: 18 April 2022

**ABSTRAK**

Budidaya udang intensif memiliki komponen utama yaitu pakan. Biaya produksi untuk pakan sebesar 50-60%. Pemberian pakan yang berlebih dapat menimbulkan limbah organik pakan. Limbah organik membentuk senyawa amoniak yang bersifat toksik terhadap udang. Senyawa amoniak dapat mengganggu pertumbuhan udang, kematian udang dan kegagalan panen. Komponen utama dalam limbah organik sisa pakan adalah protein. Permasalahan limbah organik dapat diatasi dengan melakukan bioremediasi protein pada limbah. Bakteri proteolitik dapat melakukan remediasi protein limbah pakan. Bakteri *Bacillus firmus* dari simbiosis sponge *Chalinula pseudomolitba* merupakan salah satu bakteri proteolitik yang menghasilkan enzim protease ekstraseluler. Bakteri *Bacillus firmus* memiliki potensi untuk dikembangkan menjadi probiotik dalam budidaya udang. Produksi probiotik memerlukan kultur optimal. Tujuan dari penelitian ini adalah melakukan optimasi konsentrasi glukosa dan amonium nitrat media kultur bakteri *Bacillus firmus* terhadap pertumbuhan dan aktivitas protease ekstraseluler. Penelitian menggunakan metode eksperimen laboratoris. Hasil penelitian menunjukkan perlakuan berpengaruh terhadap pertumbuhan dan aktivitas protease bakteri *Bacillus firmus*. Perlakuan penambahan co-substrat glukosa terbaik adalah konsentrasi 1%. Laju pertumbuhan sebesar 0,145 c dan aktivitas protease sebesar 23,960 c IU/ml. Perlakuan penambahan co-substrat amonium nitrat terbaik adalah 0,05%. Laju

pertumbuhan sebesar 0,157 c dan aktivitas protease sebesar 27,514 c IU/ml.

**Kata kunci** : Bakteri, Simbion, Sponge, Pertumbuhan, Protease

### ABSTRACT

Intensive shrimp farming has the main component, namely feed. Production costs for feed are 50-60%. Overfeeding can lead to feeding organic waste. Organic waste forms ammonia compounds that are toxic to shrimp. Ammonia compounds can interfere with shrimp growth, shrimp mortality, and crop failure. The main component in organic waste feed residues is the protein. The problem of organic waste can be overcome by the bioremediation of protein in the waste. Proteolytic bacteria can remediate feed waste protein. *Bacillus firmus* bacteria from the sponge symbiont *Chalinula pseudomolitba* is one of the proteolytic bacteria that produce extracellular protease enzymes. *Bacillus firmus* bacteria have the potential to be developed into probiotics in shrimp culture. Probiotic production requires optimal culture. This study aimed to optimize the concentration of glucose and ammonium nitrate in *Bacillus firmus* bacterial culture media on growth and extracellular protease activity. The research uses laboratory experimental methods. The results showed that the treatment affected the growth and protease activity of *Bacillus firmus* bacteria. The best treatment for adding glucose co-substrate is a concentration of 1%. The growth rate was 0.145 c and the protease activity was 23.960 c IU/ml. The best addition of ammonium nitrate co-substrate was 0.05%. The growth rate was 0.157 c and the protease activity was 27.514 c IU/ml.

**Keywords**: Bacteria, Symbionts, Sponges, Growth, Proteases.

### PENDAHULUAN

Budidaya udang secara intensif memiliki komponen yang utama dengan pengeluaran biaya terbesar yaitu pakan buatan. Pakan buatan memiliki nilai gizi yang tinggi yaitu berupa protein, karbohidrat, lemak, serat dan abu. Selain itu juga pakan buatan memiliki kandungan tambahan yang berupa vitamin miksa dan mineral yang esensial (Butt *et al.*, 2021 dan Tabassum *et al.*, 2021). Pakan buatan terdiri dari nutrisi yang kompleks dan lengkap sebagai fungsi meningkatkan pertumbuhan dan menjaga kesehatan tubuh udang. Pentingnya fungsi pakan buatan menuntut sistem budidaya intensif menggunakan pakan buatan yang berlebihan. Pemberian pakan yang berlebih dalam budidaya intensif mengakibatkan munculnya limbah organik pakan yang terakumulasi dalam tambak (Jasmin *et al.*, 2020).

Limbah organik pakan tersebut secara kimiawi membentuk senyawa amoniak yang bersifat toksik terhadap udang yang dibudidayakan (El-Saadony *et al.*, 2021). Senyawa amoniak dapat mengganggu pertumbuhan udang dan bahkan membunuh udang secara masal sehingga tambak

mengalami kegagalan panen (Holt *et al.*, 2021). Komponen utama dalam limbah organik sisa pakan adalah protein, sehingga untuk mengatasi permasalahan limbah ini adalah dengan cara melakukan remediasi proteinnya. Proses remediasi protein limbah pakan dapat dilakukan oleh bakteri proteolitik yaitu bakteri yang melakukan hidrolisis protein menjadi asam amino sehingga senyawa amoniak tidak terbentuk (Özacar *et al.*, 2019 dan Lananan *et al.*, 2014). Bakteri proteolitik mampu memproduksi enzim protease ekstraseluler (Schneider *et al.*, 2013).

Salah satu bakteri yang memiliki aktivitas penghasil enzim ekstraseluler tersebut adalah bakteri *Bacillus firmus*. Bakteri *Bacillus firmus* merupakan bakteri yang bersimbiosis dengan sponge *Chalinula pseudomolitba* di perairan ekosistem lamun. Sponge ini didapatkan di perairan Nusa Lembongan Bali – Indonesia. Bakteri *Bacillus firmus* memiliki potensi untuk dikembangkan menjadi konsorsium bakteri dalam produk probiotik. Konsorsium bakteri probiotik yang dapat diaplikasikan untuk membersihkan limbah organik sisa pakan pada tambak budidaya udang.

Dalam upaya tersebut maka diperlukan penelitian dalam teknologi kultur yang optimal guna mendapatkan biomassa sel. Upaya peningkatan produksi biomassa sel memerlukan penentuan konsentrasi co-substrat glukosa sebagai sumber C dan co-substrat amonium nitrat sebagai sumber N media kultur. Optimasi co-substrat media merupakan faktor penting yang mempengaruhi pertumbuhan dan biomassa sel bakteri (Zárate-Chaves *et al.*, 2013 dan Oh *et al.*, 2007). Penelitian ini memiliki tujuan mendapatkan kondisi co-substrat glukosa dan amonium nitrat media dalam kultur bakteri *Bacillus firmus* secara optimal untuk produksi biomassa bakteri.

## MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan dengan menggunakan materi utama berupa isolat bakteri *Bacillus firmus*. Bakteri *Bacillus firmus* yang bersimbiosis dengan sponge *Chalinula pseudomolitba* yang didapatkan dari perairan ekosistem lamun di Nusa Lembongan Bali – Indonesia. Nusa Lembongan memiliki karakteristik perairan yang subur dan keanekaragaman spesies spong yang baik. Perairan tersebut terdapat ekosistem lamun yang produktif.

Peremajaan isolat bakteri *Bacillus firmus* dilakukan dengan menggunakan media Nutrient Agar (NA). Sediaan bakteri *Bacillus firmus* di media miring dilakukan pengambilan isolat secara aseptis. selanjutnya isolat tersebut digores pada media NA di dalam cawan petri. Hasil goresan tersebut dilakukan inkubasi pada suhu 37 °C dalam inkubator selama 24 jam (Pringgenies *et al.*, 2021 dan Wijaya, 2021). Koloni bakteri yang terbentuk siap untuk digunakan. Satu koloni bakteri hasil peremajaan dilakukan pengambilan dengan ose dan dimasukkan ke dalam medium zobell 221E cair 20 ml di tabung reaksi. Selanjutnya hasil inokulasi tersebut disimpan dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 30°C. Selanjutnya melakukan *scale up* menggunakan medium zobell 221E cair 200 ml dalam erlenmeyer ukuran 500 ml. *Scale up* dilakukan seker dengan kecepatan 150 rpm selama 24 jam pada suhu 30 °C (Ayuningtyas *et al.*, 2021)

Co-substrat sebagai sumber karbon yang digunakan adalah glukosa. Glukosa digunakan dalam eksperimen perbedaan konsentrasi yaitu 1%, 2%, dan 4%. Optimasi konsentrasi ko-substrat karbon dilakukan pada kultur di media zobell 2216E broth yang diperkaya dengan susu skim 1%, penambahan ko-substrat glukosa dengan konsentrasi 1, 3 dan 5%, ditambahkan stater bakteri sebanyak 1% dengan OD 0,01 pada Absorbansi panjang gelombang 600 nm, pH media 8, salinitas 30 ppt, dan inkubasi pada suhu ruang. Selanjutnya dilakukan sampling jam ke- 0, 2, 4, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, dan 48 untuk pengamatan pertumbuhan bakteri, aktivitas protease ekstraseluler dan kadar protein (Awad *et al.*, 2021).

Co-substrat sebagai sumber nitrogen yang digunakan adalah amonium nitrat. Amonium nitrat digunakan dalam eksperimen perbedaan konsentrasi yaitu 0,05%, 0,2%, 0,45%. Optimasi konsentrasi ko-substrat nitrogen dilakukan pada kultur di media zobell 2216E broth yang diperkaya dengan susu skim 1%, penambahan ko-substrat amonium nitrat dengan konsentrasi 0,05; 0,20 dan 0,45%. ditambahkan isolat stater 1%, media diatur pada pH 8 dan salinitas 30 ppt. Kultur dilakukan inkubasi pada suhu ruang. Dalam masa kultur dilakukan pengambilan sampel pada jam pengamatan (Girsang *et al.*, 2020). Pertumbuhan bakteri diketahui dengan cara melakukan pengukuran kepadatan bakteri dengan metode spektrofotometri. Sebanyak 10 ml sampel kultur dilakukan sentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 3000 rpm. Natan yang terbentuk dilarutkan menggunakan 10 ml PBS dan dihomogenkan. Larutan bakteri dalam PBS tersebut dilakukan spektrofotometer pada 600 nm (Setyati *et al.*, 2014). Data OD yang didapatkan kemudian di konversi dengan persamaan standart *Mc Farland* menjadi satuan sel/ml. Nilai kepadatan bakteri satuan sel/ml untuk menentukan nilai jumlah, waktu generasi dan laju pertumbuhan ( $\mu$ ).

Enzim protease dalam kultur dilakukan pengamatan menggunakan metode kaseinase dan pengukuran data menggunakan spektrofotometri. Metode ini menggunakan kasein 1% sebagai substrat yang terlarut dalam 50 mM buffer fosfat dengan pH 8. Substrat direaksikan dengan sampel masing-masing sebanyak 1 ml dan didiamkan 10 menit pada suhu 37 °C. Setelah inkubasi, larutan ditambah Trichloroacetic Acid (TCA) 10% sebanyak 1 ml. Larutan didiamkan 10 menit, kemudian dilakukan sentrifugasi selama 20 menit pada kecepatan 10.000 rpm. Dilakukan pengambilan cairan 1 ml dan di tambah Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 M dan folin ciocalteus perbandingan (1:2), campuran didiamkan selama 30 menit. Setelah inkubasi dilakukan spektrofotometri pada panjang gelombang 660 nm (Setyati *et al.*, 2015). Data spektrofotometri dikonversi menggunakan persamaan standar tirosin ke satuan mM. Berdasarkan nilai mM selanjutnya penentuan nilai AP (aktivitas protease) dengan satuan (IU/ml) dan T.AP (total protease) dengan satuan (IU).

Penentuan nilai kadar protein menggunakan Bovin Serum Albumin (BSA). Standart BSA kisaran 0.01-0.1 mg/mL digunakan sebagai protein standar. Sampel di lakukan pereaksian dengan larutan bradford dan dilakukan pengukuran absorbansi spektrofotometri pada  $\lambda$  595 nm. Data absorbansi protein digunakan untuk penentuan nilai KP (kadar protein)

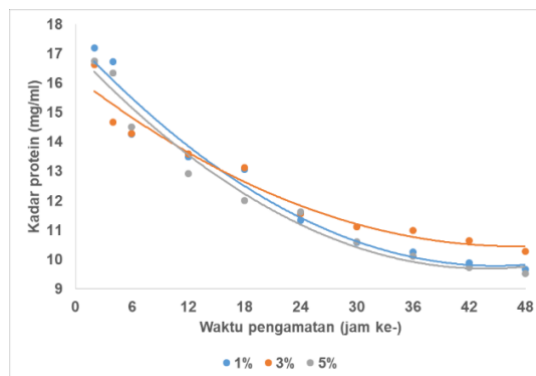
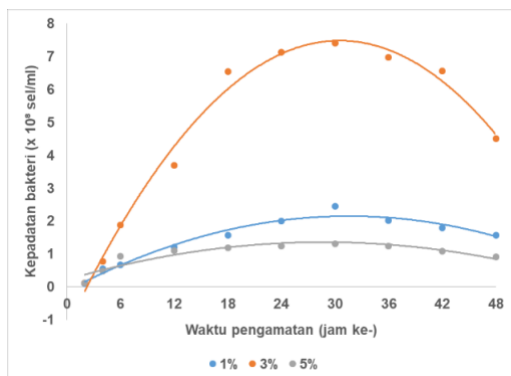
satuan (gram/ml) dengan menggunakan persamaan standart BSA. Selanjutnya dilakukan penentuan nilai TP (total protein) dengan satuan gram dan AS (aktivitas spesifik) satuan IU/mg.

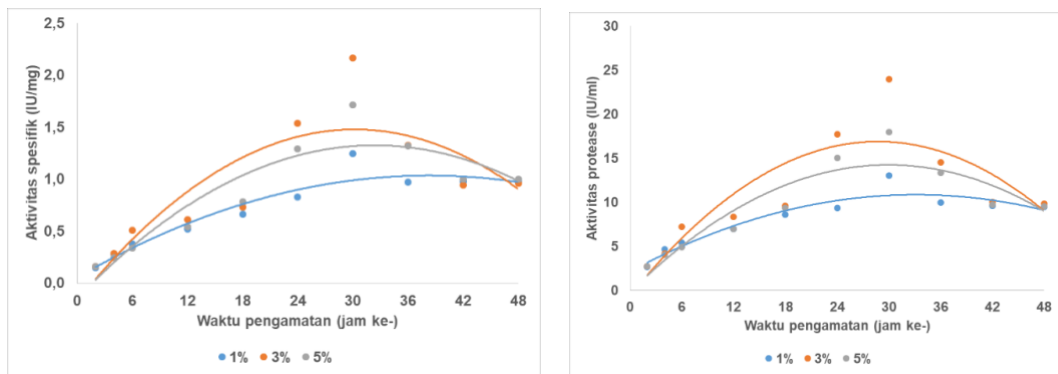
## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Optimasi Sumber C Glukosa

Optimasi sumber C dilakukan terhadap perbedaan konsentrasi yaitu 1%, 3% dan 5%. Berdasarkan hasil penelitian memberikan informasi bahwa perlakuan optimasi sumber C berpengaruh nyata ( $\alpha < 0,05$ ) terhadap pertumbuhan bakteri *Bacillus firmus*. Pengaruh perlakuan perbedaan konsentrasi sumber C terhadap respon pola polynomial pertumbuhan bakteri dari yang terendah ke tertinggi secara berurutan adalah 5%, 1% dan 3% dengan nilai kepadatan bakteri pada puncak polynomial sebesar 1,310; 2,458 dan 7,403 x 10<sup>8</sup> sel/ml. Perlakuan penambahan sumber C 3% adalah yang terbaik terhadap pertumbuhan dengan pola polynomial  $y = -0,0093x^2 + 0,5704x - 1,2259$ ;  $R^2 = 0,9878$ ;  $R = 0,994$ .

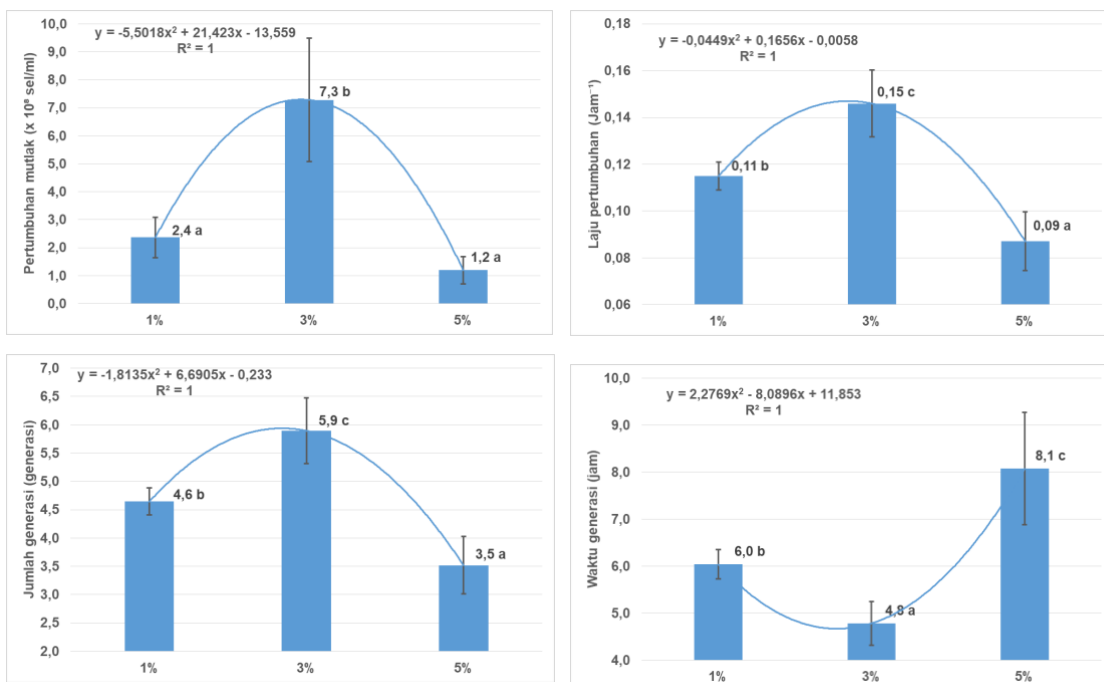
Perlakuan perbedaan konsentrasi sumber C berpengaruh signifikan terhadap pertumbuhan mutlak, laju pertumbuhan, jumlah generasi dan waktu generasi bakteri. Nilai pertumbuhan mutlak bakteri secara berurutan dari terendah ke tertinggi adalah 5%, 1% dan 3% dengan nilai 1,194 a, 2,362 a dan 7,280 b x 10<sup>8</sup> sel/ml. Nilai laju pertumbuhan bakteri secara berurutan dari terendah ke tertinggi adalah 5%, 1% dan 3% dengan nilai 0,087 a, 0,114 b dan 0,145 c. Nilai jumlah generasi secara berurutan dari terendah ke tertinggi adalah 5%, 1% dan 3% dengan nilai 3,516 a, 4,644 b dan 5,893 c. Nilai waktu generasi secara berurutan dari terendah ke tertinggi adalah amonium 3%, 1% dan 5% dengan nilai 4,781 a, 6,040 b dan 8,075 c.





**Gambar 1.** Optimasi sumber C terhadap polinomial pertumbuhan, aktivitas protease, kadar protein dan aktivitas spesifik protease bakteri *Bacillus firmus*

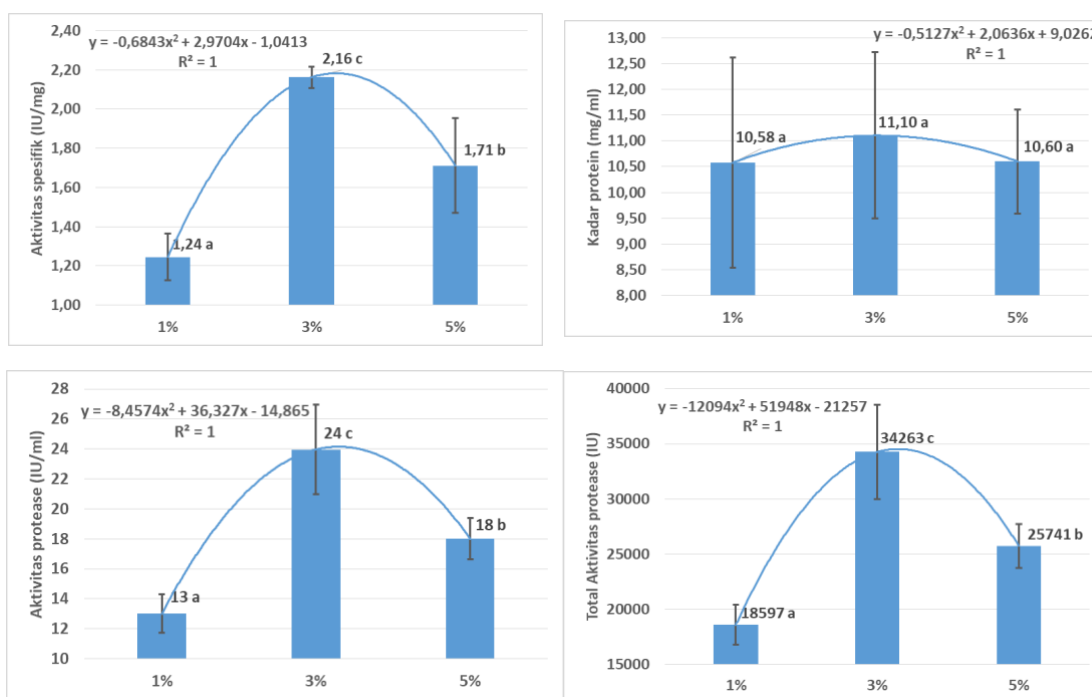
Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan perbedaan konsentrasi sumber C berpengaruh signifikan ( $\alpha < 0,05$ ) terhadap aktivitas protease dan aktivitas spesifik protease bakteri *Bacillus firmus*. Pengaruh perbedaan konsentrasi sumber C terhadap respon pola polinomial aktivitas protease bakteri dari yang terendah ke tertinggi secara berurutan adalah 1%, 5% dan 3% dengan nilai aktivitas protease pada puncak polinomial sebesar 13,004 a, 18,000 b dan 23,960 c IU/ml. Perlakuan sumber C konsentrasi 3% adalah yang terbaik terhadap aktivitas protease dengan pola polinomial  $y = -0,0212x^2 + 1,2200x - 0,6476$ ;  $R^2 = 0,7343$ ;  $R = 0,857$ .



**Gambar 2.** Pengaruh perbedaan konsentrasi glukosa terhadap pertumbuhan mutlak, laju pertumbuhan, jumlah dan waktu generasi bakteri *Bacillus firmus*.

Pengaruh perbedaan konsentrasi sumber C terhadap respon pola polynomial kadar protein bakteri dari yang terendah ke tertinggi secara berurutan adalah 1%, 5% dan 3% dengan nilai kadar protein pada inkubasi jam ke- 30 sebesar 10,577 a, 10,602 a dan 11,102 a mg/ml. Perlakuan konsentrasi sumber C 3% adalah yang terbaik terhadap kadar protein dengan pola polynomial  $y = 0,0026x^2 - 0,2447x + 16,206$ ;  $R^2 = 0,9521$ ;  $R = 0,976$ .

Pengaruh perbedaan konsentrasi sumber C terhadap respon pola polynomial aktivitas spesifik protease bakteri dari yang terendah ke tertinggi secara berurutan adalah 1%, 5% dan 3% dengan nilai aktivitas spesifik protease pada puncak polynomial sebesar 1,244 a, 1,711 b dan 2,162 c IU/mg. Perlakuan konsentrasi sumber C 3% 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 konsentrasi sumber C maka dapat disimpulkan bahwa perlakuan konsentrasi sumber C 3% adalah yang terbaik dalam kultur bakteri *Bacillus firmus*.



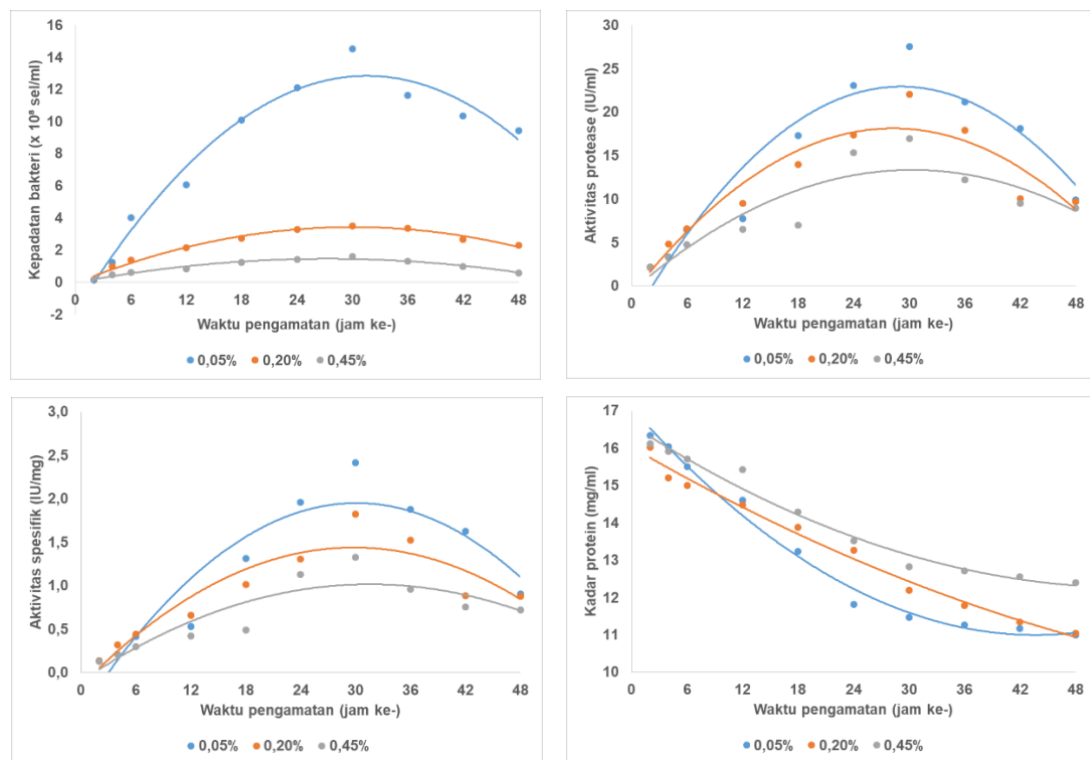
**Gambar 3.** Pengaruh perbedaan konsentrasi glukosa terhadap aktivitas protease, kadar protein, aktivitas spesifik dan total aktivitas protease bakteri *Bacillus firmus*.

Glukosa dengan tingkat tertentu dapat meningkatkan degradasi fenol namun dengan kadar glukosa yang lebih tinggi hasilnya adalah sebaliknya yaitu glukosa mengurangi efisiensi penghilangan fenol (Prakash Shyam *et al.*, 2021). Fermentasi dengan media kompleks yang mengandung substrat glukosa sebagai sumber karbon dan sumber energi.

Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi glukosa 2% merupakan kondisi optimum untuk produksi hidrogen (Hu *et al.*, 2021).

### Optimasi Sumber N Amonium Nitrat

Optimasi sumber N dilakukan terhadap perbedaan konsentrasi yaitu 0,05%, 0,2% dan 0,45%. Hasil penelitian menunjukkan perlakuan perbedaan konsentrasi sumber N berpengaruh ( $\alpha < 0,05$ ) terhadap pertumbuhan bakteri *Bacillus firmus*. Pengaruh perlakuan perbedaan konsentrasi sumber N terhadap respon pola polynomial pertumbuhan bakteri dari yang terendah ke tertinggi secara berurutan adalah 0,45%, 0,2% dan 0,05% dengan nilai kepadatan bakteri pada puncak polynomial sebesar 1,603; 3,502 dan 14,508 x 10<sup>8</sup> sel/ml. Perlakuan penambahan sumber N 0,05% adalah yang terbaik terhadap pertumbuhan dengan pola polynomial  $y = -0,0147x^2 + 0,9303x - 1,8450$ ;  $R^2 = 0,9666$ ;  $R = 0,983$ .



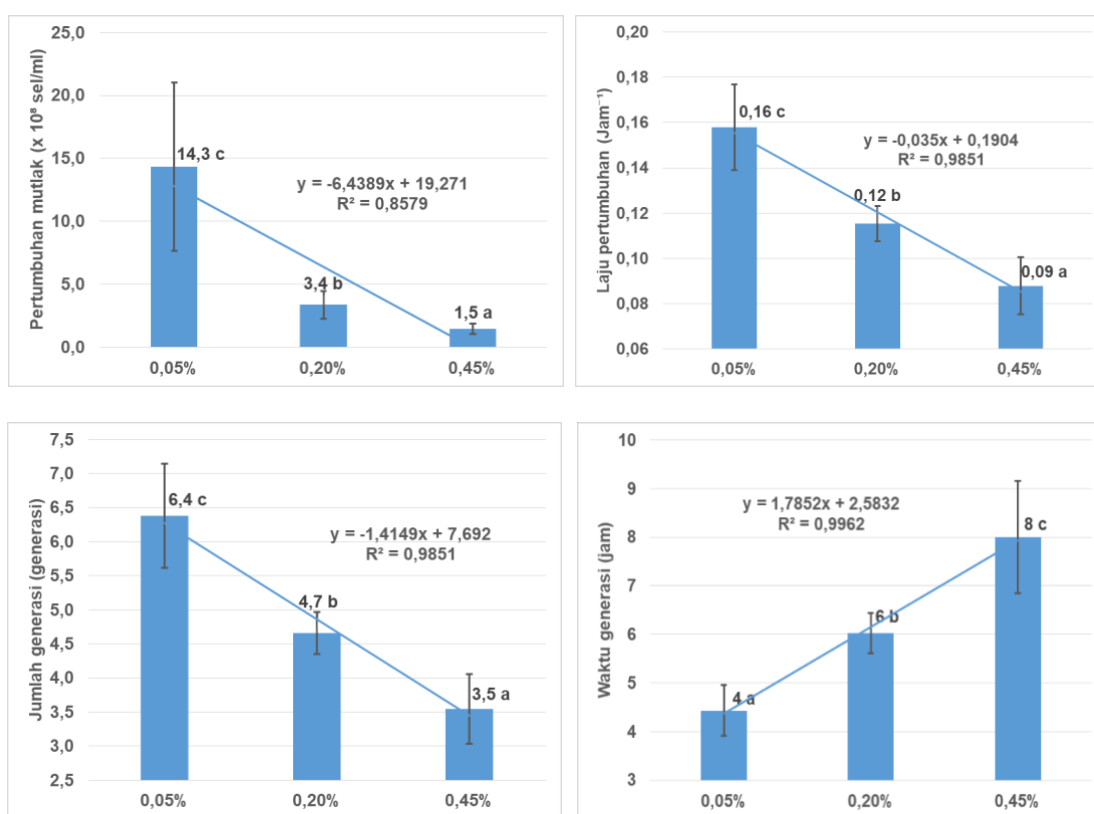
**Gambar 4.** Optimasi sumber N terhadap Polynomial pertumbuhan, aktivitas proteasen kadar protein dan aktivitas spesifik protease bakteri *Bacillus firmus*.

Perlakuan perbedaan konsentrasi 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 0,45, 0,2% dan 0,05% dengan nilai 1,467 a, 3,366 b dan 14,346 c x 10<sup>8</sup> sel/ml. Nilai laju pertumbuhan bakteri secara berurutan dari terendah ke tertinggi adalah 0,45, 0,2% dan 0,05% dengan



nilai 0,087 a, 0,115 b dan 0,157 c nilai jumlah generasi secara berurutan dari terendah ke tertinggi adalah 0,45, 0,2% dan 0,05% dengan nilai 3,547 a, 4,661 b dan 6,377 c. Nilai waktu generasi secara berurutan dari terendah ke tertinggi adalah 1%, 0,2% dan 0,45% dengan nilai 4,432 a, 6,025 b dan 8,002 c.

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan perbedaan konsentrasi sumber N berpengaruh signifikan ( $\alpha < 0,05$ ) terhadap aktivitas protease dan aktivitas spesifik protease bakteri *Bacillus firmus*. Pengaruh perbedaan konsentrasi sumber N terhadap respon pola polynomial aktivitas protease bakteri dari yang terendah ke tertinggi secara berurutan adalah 0,45%, 0,2% dan 0,05% dengan nilai aktivitas protease pada puncak polynomial sebesar 16,936 a, 22,036 b dan 27,514 c IU/ml. Perlakuan konsentrasi sumber N 0,05% adalah yang terbaik terhadap aktivitas protease dengan pola polynomial  $y = -0,0318x^2 + 1,8492x - 3,9758$ ;  $R^2 = 0,9006$ ;  $R = 0,949$ .

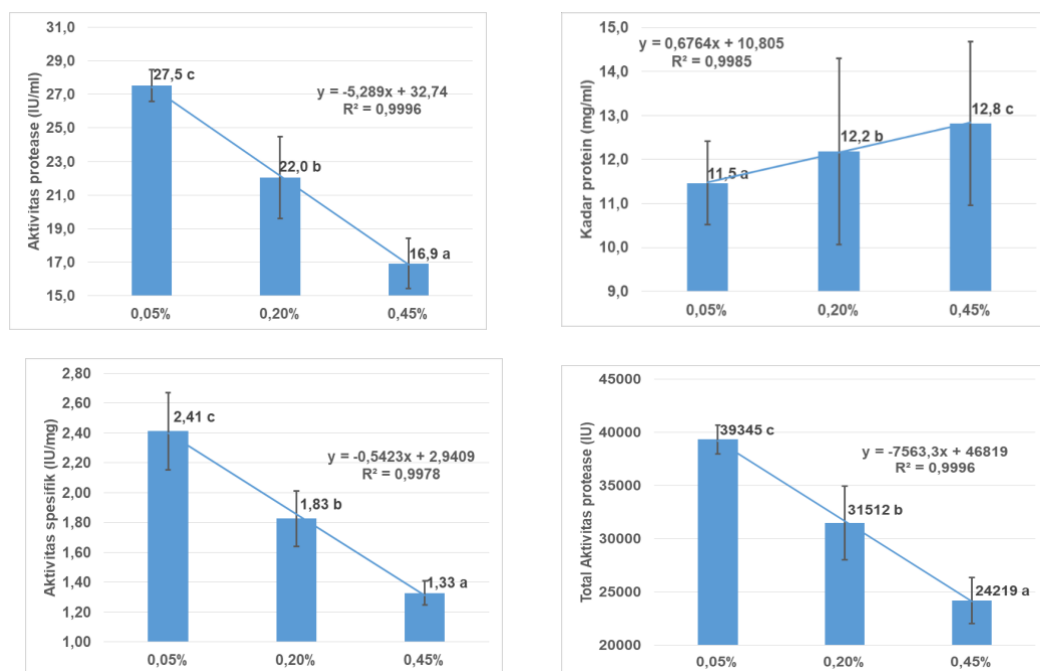


**Gambar 5.** Pengaruh perbedaan konsentrasi amonium nitrat terhadap pertumbuhan mutlak, laju pertumbuhan, jumlah dan waktu generasi bakteri *Bacillus firmus*.

Pengaruh perbedaan konsentrasi sumber N terhadap respon pola polynomial kadar protein bakteri dari yang terendah ke tertinggi secara berurutan adalah 0,05%, 0,2% dan 0,45% dengan nilai kadar protein pada inkubasi jam ke- 30 sebesar 11,467 a, 12,188 a dan 12,819 a mg/ml. Perlakuan konsentrasi sumber N 0,05% adalah yang terbaik terhadap kadar

protein dengan pola polynomial  $y = 0,0032x^2 - 0,2785x + 17,080$ ;  $R^2 = 0,9896$ ;  $R = 0,995$ . Pengaruh perbedaan konsentrasi sumber N terhadap respon pola polynomial aktivitas spesifik protease bakteri dari yang terendah ke tertinggi secara berurutan adalah 0,45%, 0,2% dan 0,05%. Dengan nilai aktivitas spesifik protease pada puncak polynomial sebesar 1,328 a, 1,826 b dan 2,413 c IU/mg.

Perlakuan konsentrasi sumber N 0,05% adalah yang terbaik terhadap aktivitas spesifik protease dengan pola polynomial  $y = -0,0027x^2 + 0,1598x - 0,4528$ ;  $R^2 = 0,8794$ ;  $R = 0,938$ . Berdasarkan penelitian perbedaan konsentrasi sumber C maka dapat disimpulkan bahwa perlakuan konsentrasi sumber N 0,05% adalah yang terbaik dalam kultur bakteri *Bacillus firmus*.



**Gambar 6.** Pengaruh perbedaan konsentrasi amonium nitrat terhadap aktivitas protease, kadar protein, aktivitas spesifik dan total aktivitas protease bakteri *Bacillus firmus*.

Nitrogen dalam media digunakan dalam produksi enzim protease ekstraseluler. Kebutuhan nitrogen bakteri adalah spesifik yaitu dapat berbeda dari sumber nitrogen ataupun konsentrasi yang dibutuhkan secara optimal (Sousi *et al.*, 2021). Bakteri *Bacillus* sp tumbuh dengan baik dan optimal dalam memproduksi enzim protease alkali dengan menggunakan media yang ditambahkan dengan sumber nitrogen dari amonium nitrat. Konsisi optimal sumber C dan N kultur bakteri *Bacillus* sp untuk produksi enzim protease adalah glukosa konsentrasi 2 % dan amonium nitrat konentras 0,05 % (Stylianou *et al.*, 2021).

## KESIMPULAN

Penelitian telah berhasil melakukan uji optimasi pertumbuhan dan aktivitas enzim protease ekstraseluler bakteri *Bacillus firmus* simbiosis sponge *Chalinula pseudomolitba*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri *Bacillus firmus* memiliki laju pertumbuhan dan aktivitas protease terbaik pada kondisi kultur dengan penambahan co-substrat glukosa sebagai sumber karbon pada konsentrasi 1% yaitu dengan nilai sebesar 0,145 c dan 23,960 c IU/ml. selain itu juga, dengan penambahan co-substrat amonium nitrat sebagai sumber nitrogen pada konsentrasi 0,05% dengan nilai sebesar 0,157 c dan 27,514 c IU/ml.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih peneliti sampaikan kepada DIKTI yang 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

- Awad, G., & Garnier, A. 2021. Promising Optimization of Bacterial Cytochrome P450BM3 Enzyme Production by Engineered *Escherichia coli* BL21. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 31 : 1–9.
- Ayuningtyas, E. P., Sibero, M. T., Hutapea, N. E. B., Frederick, E. H., Murwani, R., Zilda, D. S., Wijayanti, D. P., Sabdon, A., Pringgines, D., & Radjasa, O. K. 2021. Screening of Extracellular Enzyme from Phaeophyceae-Associated Fungi. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 750 : 1–10.
- Butt, U. D., Lin, N., Akhter, N., Siddiqui, T., Li, S., & Wu, B. 2021. Overview of The Latest Developments in The Role of Probiotics, Prebiotics and Synbiotics in Shrimp Aquaculture. *Fish and Shellfish Immunology*. 114 : 263–281.
- El-Saadony, M. T., Alagawany, M., Patra, A. K., Kar, I., Tiwari, R., Dawood, M. A. O., Dhama, K., & Abdel-Latif, H. M. R. 2021. The Functionality of Probiotics in Aquaculture: An Overview. *Fish and Shellfish Immunology*. 117 : 36–52.
- Girsang, P. H., Pringgines, D., Yudiati, E., Santosa, G. W., & Djunaedi, A. 2020. Exploration of Sea Cucumber Intestinal Symbiont Microbe As Probiotic Microbe Candidate in Healthcare Products. *JFMR-Journal of Fisheries and Marine Research*. 4 (1) : 27–34.
- 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.

Hu, H., Catchmark, J. M., & Demirci, A. 2021. Co-Culture Fermentation on The Production of Bacterial Cellulose Nanocomposite Produced by *Komagataeibacter hansenii*. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*. 2 : 1–9.

Jasmin, M. Y., Syukri, F., Kamarudin, M. S., & Karim, M. 2020. Potential of Bioremediation in Treating Aquaculture Sludge. *Aquaculture*. 519 : 1–5.

Lananan, F., Abdul Hamid, S. H., Din, W. N. S., Ali, N., Khatoon, H., Jusoh, A., & Endut, A. 2014. Symbiotic Bioremediation of Aquaculture Wastewater in Reducing Ammonia and Phosphorus Utilizing Effective Microorganism (EM-1) and Microalgae (*Chlorella* sp.). *International Biodeterioration and Biodegradation*. 95 : 1–8.

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.

Özacar, M., Mehde, A. A., Mehdi, W. A., Özacar, Z. Z., & Severgün, O. 2019. The Novel Multi Cross-Linked Enzyme Aggregates of Protease, Lipase, and Catalase Production From The Sunflower Seeds, Characterization and Application. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 173 : 58–68.

Prakash Shyam, K., Rajkumar, P., Ramya, V., Sivabalan, S., Kings, A. J., & Miriam, L. R. M. 2021. Exopolysaccharide Production by Optimized Medium Using Novel Marine *Enterobacter cloacae* MBB8 Isolate and its Antioxidant Potential. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*. 2 : 1–10.

Pringgengies, D., Setyati, W. A., Djunaedi, A., Pramesti, R., Rudiyantri, 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.

Schneider, J. S., & Glickman, M. S. 2013. Function of Site-2 Proteases in Bacteria and Bacterial Pathogens. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 18 (28) : 2808–2814.

Setyati, W. A., Martani, E., Triyanto, Subagiyo, & Zainuddin, M. 2014. Consortium of Mangrove Ecosystems as Bioremediation and Biocontrol in Shrimp Ponds. *JPHPI*. 17(3) : 243–253.

Setyati, W. A., Martani, E., Triyanto, Subagiyo, & 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.

Sousi, M., Salinas-Rodriguez, S. G., Liu, G., Dusseldorp, J., Kemperman, A. J. B., Schippers, J. C., Van der Meer, W. G. J., & Kennedy, M. D. 2021. Comparing the Bacterial Growth Potential of Ultra-Low Nutrient Drinking Water Assessed by Growth Tests Based on Flow Cytometric Intact Cell Count Versus Adenosine Triphosphate. *Water Research*. 203 : 1–9.

Stylianou, E., Pateraki, C., Ladakis, D., Vlysidis, A., & Koutinas, A. 2021. Optimization of Fermentation Medium for Succinic Acid Production Using *Basfia succinici* Producing. *Environmental Technology and Innovation*. 24 : 1-10.

Tabassum, T., Sofi Uddin Mahamud, A. G. M., Acharjee, T. K., Hassan, R., Akter Snigdha, T., Islam, T., Alam, R., Khoiam, M. U., Akter, F., Azad, M. R., Al Mahamud, M. A., Ahmed, G. U., & Rahman, T. 2021. Probiotic Supplementations Improve Growth, Water Quality, Hematology, Gut Microbiota and Intestinal Morphology of *Nile tilapia*. *Aquaculture Reports*. 21 : 1–13.

Wijaya, P. A., Pringgienis, 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*). *JFMR-Journal of Fisheries and Marine Research*. 5(1) : 15–21.

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.