

Isolasi, Seleksi dan Identifikasi Genotipik 16 S-rRNA Bakteri Proteolitik Indogeneous Dari Ekosistem Mangrove Karimunjawa Sebagai Kandidat Konsorsium Probiotik Untuk Bioremediasi Limbah Organik Tambak.

Muhammad Zainuddin

Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Sain dan Teknologi,
Universitas Islam Nahdlatul Ulama Jepara.
E-mail : zainudin@unisnu.ac.id

Abstrak

Penelitian ini merupakan tahap awal yang bertujuan untuk melakukan isolasi, seleksi dan identifikasi genotipik 16 S-rRNA bakteri proteolitik indogeneous dari ekosistem mangrove sebagai kandidat konsorsium probiotik untuk bioremediasi limbah organik tambak. Target khusus yang ingin dicapai pada penelitian ini adalah mendapatkan isolat bakteri yang mampu menghasilkan enzim proteolitik ekstraseluler yang berfungsi melakukan proses remediasi protein. Penelitian ini terbagi menjadi 5 tahap yaitu sampling, isolasi, purifikasi, uji proteolitik, uji antagonis, dan identifikasi genotipik 16 S-rRNA. Hasil sampling di Karimunjawa ditemukan 8 jenis mangrove yang menyusun populasi hutan mangrove. Jenis – jenis tersebut adalah *A. alba*, *Avicennia marina*, *R. mucronata*, *Sonneratia caeseolaris*, *Rhizophora apiculata*, *Nypa fruticans*, *Bruguiera cylindrical* dan *Aegiceras corniculatum*. Hasil isolasi, inokulasi dan purifikasi bakteri yang memiliki aktivitas proteolitik didapatkan sebanyak 56 isolat. Tiga isolat mempunyai aktivitas paling tinggi adalah isolat 44, isolat 17 dan isolat 30 yaitu sebesar 27,77^{ab}; 30,67^b dan 40,63^c. Hasil uji antagonis menunjukkan bahwa 10 isolat terbaik saling tidak antagonis. Hasil pengamatan OD isolat 30 menunjukkan bahwa fase lag terjadi pada jam ke-0 hingga ke-4 jam pertama. Fase logaritmik (eksponensial) terjadi pada jam ke-4 hingga ke-12 jam. Selanjutnya pada jam ke-12 hingga jam ke-42 bakteri mengalami fase penurunan yaitu kematian. Bakteri memiliki nilai jumlah generasi sebesar 7,113; waktu generasi sebesar 1,686 jam dan laju pertumbuhan bakteri sebesar 0,410 jam⁻¹. Hasil pengamatan aktivitas protease bakteri menunjukkan bahwa jam ke-0 hingga ke-6 jam merupakan fase aktivitas protease awal. Pada waktu inkubasi ke-6 hingga ke-18 jam merupakan fase aktivitas protease eksponensial. Pada jam ke-24 hingga akhir waktu pertumbuhan jam ke-48, aktivitas protease bakteri mengalami fase penurunan. Bakteri memiliki nilai aktivitas spesifik sebesar 122,4 IU/mg; total aktivitas protease sebesar 2307,3 IU dan aktivitas protease sebesar 3,296 IU/ml. Hasil amplifikasi dan fisualisasi engan gel dox menunjukkan bahwa isolat 30 menghasilkan single band (pita tunggal) dengan ukuran sekitar 1.300 bp (base pair). Hasil BLAST homologi menunjukkan bahwa isolat 30 memiliki homologi sebesar 97% dengan bakteri *Bacillus aquimaris*.

Kata kunci : Budidaya, Udang, Limbah, Isolat, Bioremediasi

PENDAHULUAN

Strategi pengendalian lingkungan dan penyakit pada budidaya akuatik, tindakan preventif melalui aplikasi probiotik merupakan strategi yang paling penting dan memberikan tingkat keberhasilan yang paling tinggi dan tidak menyebabkan gangguan pada ekosistem budidaya itu sendiri. Probiotik merupakan pendekatan yang paling tepat karena dapat berfungsi sebagai bioremediasi dan biokontrol yang merupakan rangkaian proses untuk dapat mendukung kelangsungan biota yang terpelihara di dalamnya. Saat ini produk probiotik sudah dipasarkan dan digunakan oleh petani budidaya. Akan tetapi, sebagian besar probiotik masih memiliki kelemahan diantaranya adalah aktifitas yang dimiliki adalah spesifik, berspektrum sempit, terdiri dari isolat tunggal dan berasal dari ekosistem tambak itu sendiri.

Selama ini bakteri probiotik yang digunakan sebagai pembersih lingkungan dari bahan pencemar tidak mempunyai kemampuan bioaktivitas lain seperti antibakterial. Atau bakteri probiotik yang digunakan sebagai biokontrol dalam menekan patogen tidak mempunyai kemampuan dalam proses dekomposisi bahan organik. Oleh karena itu masalah yang muncul

dalam pengembangan probiotik adalah mencari bakteri probiotik yang mempunyai aktivitas ganda yaitu tidak hanya mampu pembersih lingkungan dari bahan pencemar (bioremediasi) tetapi juga mempunyai kemampuan bioaktivitas antibakterial (mekanisme antagonis) dalam menekan populasi patogen (biokontrol).

Saat ini penelitian mengenai penggunaan bakteri sebagai pengendali hayati terhadap penyakit udang masih berupa isolat jenis tunggal. Probiotik komersil sebagai agent pengendali penyakit yang sudah ada saat ini sebagian besar menunjukkan aktifitasnya spektrum sempit terhadap bakteri *Vibrio* terutama *V. harveyi*. Selain itu isolat bakteri yang dikembangkan sebagai agensia pengendali penyakit menunjukkan bahwa sebagian besar diisolasi dari ekosistem tambak itu sendiri yaitu dari sedimen dan air tambak (Verschuere et al.,2000; Zhou et al.,2008), ikan, udang, rotifer dan mikroalgae (Verschuere et al.,2000; Gram et al.,1999), air laut (Verschuere et al.,2000; Isnansetyo, 2009). Ekosistem tambak merupakan ekosistem yang telah tercemar oleh akumulasi bahan organik selama proses budidaya sehingga menyebabkan keanekaragaman mikroorganisme yang ada sangat rendah. Dampak dari

rendahnya keanekaragaman mikroorganisme di lokasi sampling adalah kecilnya variasi jenis konsorsium dan kecilnya kemampuan isolat kandidat probiotik yang didapatkan. Oleh karena itu diperlukan penelitian mengenai pengembangan probiotik yang berasal dari ekosistem non tambak dengan harapan semakin variasinya jenis isolat bakteri yang didapatkan, variasinya aktivitas yang dimiliki dan tingginya aktivitas tersebut untuk dikembangkan menjadi suatu konsorsium probiotik. Salah satu sumber keanekaragaman mikroorganisme yang tinggi adalah dari ekosistem mangrove.

MATERI DAN METODE.

Survey dan sampling sedimen.

Penelitian ini melakukan survey di karimunjawa untuk mencari informasi mengenai keberadaan ekosistem mangrove. Peneliti melakukan survey dan pengambilan sedimen ekosistem mangrove di tiga titik sampling (**Gambar 1**). Pada stasiun sampling dilakukan pengamatan komposisi ekosistem mangrove. Sampel sedimen ekosistem mangrove diambil menggunakan soil sampler hingga kedalaman 10-15 cm. Sampel sedimen di letakkan di dalam wadah sampel dan kemudian dibawa ke laboratorium.

Isolasi bakteri dan Purifikasi

Metode yang akan digunakan dalam penanaman bakteri adalah metode Pour Plate (Agar tuang). Diambil 10 gram dari masing-masing sampel sedimen mangrove ke dalam labu erlenmeyer yang berisi 90 ml air laut steril (70%), divortex hingga homogen dan diperoleh pengenceran 10-1. Selanjutnya dari pengenceran 10-1 diambil 1 ml dengan menggunakan pipet steril kemudian dimasukkan ke dalam 9 ml air laut steril (70%) dan diperoleh pengenceran 10-2. Demikian selanjutnya dilakukan pengenceran hingga diperoleh 10-3, 10-4 dan 10-5. Masing-masing pengenceran ditanam secara pour-plate ke dalam media Zobell 2216E agar dan di inkubasi selama 24 jam dengan suhu 30°C. Koloni-koloni yang tumbuh dilakukan identifikasi morfologi koloni, dan kemudian dimurnikan dengan metode goresan. Isolat murni selanjutnya disimpan sebagai kultur miring.

Uji kualitatif dan kuantitatif proteolitik

Uji kemampuan isolat bakteri menghasilkan enzim proteolitik dilakukan dengan prosedur menurut Bairagi et al., (2002). Uji kualitatif aktivitas proteolitik dilakukan dengan cara menginokulasikan dengan sistem dotting 1 ose isolat murni ke dalam medium Zobell 2216E agar yang diperkaya dengan skim-milk (1%). Inkubasi pada 30°C selama 24 jam. Identifikasi aktivitas proteolitik ditunjukkan dengan terbentuk zona bening.

Uji kuantitatif aktivitas proteolitik dilakukan dengan cara menginokulasikan 1 ose isolat murni ke dalam media Zobell 2216E cair dan diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 30°C. Empat puluh µl kultur isolat umur 24 jam diteteskan di atas paper disk (Advantec) pada medium Zobell 2216E agar yang diperkaya dengan skim-milk (1%). Inkubasi pada 30°C selama 24 jam. Identifikasi aktivitas proteolitik ditunjukkan dengan terbentuk zona bening. Zona bening yang terbentuk di lakukan pengukuran diameter. Isolat bakteri proteolitik selanjutnya disimpan pada media Zobell 2216E miring.

Uji aktivitas proteolitik fermentor.

Pengukuran pertumbuhan bertujuan untuk mengetahui karakter pertumbuhan isolat dan waktu optimal dalam produksi enzim protease. Pada kultur ini menggunakan fermentor skala 2 liter dengan volume kerja 1 liter. Kondisi dari fermentor yaitu media Zobell 2216E broth yang diperkaya dengan glukosa 2% dan amonium nitrat 0,05%, konsentrasi inokulum 1% dengan OD 0,01 pada A600, pH8, suhu 30°C, salinitas 30 ppt, kecepatan agitasi 150 rpm. Pengamatan dilakukan terhadap nilai optical density (OD) bakteri dan aktivitas protease pada inkubasi 0, 2, 4, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, dan 48 jam (Annamalai et al.,2011).

Sedangkan supernatan yang diperoleh selanjutnya dilakukan pengujian aktivitas proteolitik dengan metode kaseinolitik menurut Annamalai et al., (2011). Dua ratus µl supernatan ditambahkan ke dalam campuran 100 µl buffer Tris-HCl (100 mM, pH 8) dan 100 µl larutan kasein 1%. Kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 400 µl larutan TCA 10%. Kasein yang tidak terhidrolisis diendapkan dengan sentrifugasi 3000 rpm selama 15 menit. Aktivitas proteolitik ditunjukkan oleh besarnya protein yang terhidrolisis. Aktivitas protease dilakukan spektrofotometri pada panjang gelombang (λ) = 660 nm.



Gambar 1. Stasiun pengambilan sampling

Identifikasi Genotipik

Isolasi dilakukan ekstraksi dan analisis 16S-rRNA melalui Polymerase Chain Reaction (PCR). Amplifikasi gen 16S-rRNA dilakukan menggunakan kit RTG PCR Beads dan universal primer spesifik prokaryot, yaitu : 63f (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC) dan 1387r (5' - GGGCG GWGTGT ACAA GGC).

Siklus termal yang digunakan untuk proses amplifikasi adalah : Pre-PCR (94°C, 2 menit), denaturasi (92°C, 30 detik), Anneling primer (55°C, 30 detik), Elongation (75°C, 1 menit), dan Post PCR (75°C, 5 menit), dengan siklus sebanyak 30 kali.

Hasil PCR kemudian dielektroforesis pada mini-gel (BioRad Mini-Sub Cell GT CA, USA), selama 45 menit, selanjutnya diamati di bawah UV Transluminator (Hoefer Scientific Instrumets, San Francisco, USA). Hasil amplifikasi gen 16S-rRNA yang positif kemudian disekuensing. Data hasil sekuensing selanjutnya dianalisis homologi berdasarkan data genetik yang ada di genbank. Analisis dilakukan secara online pada <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>. Analisis filogenetik terhadap jenis-jenis bakteri hasil seleksi dilakukan menggunakan Phylogenetics Software TreeView.

ANALISIS DATA

Data sampling, isolasi, purifikasi, dan uji antagonis diolah dengan statistik deskriptif dan hasil pengolahan dibahas secara diskriptif eksploratif. Data aktivitas proteolitik dilakukan uji one way anova dan uji lanjut Tukey dengan program SPSS 16, hasil pengolahan digunakan untuk menentukan isolat yang secara signifikan ($p < 0,05$) memiliki aktivitas proteolitik terbaik. Data elektroforesis diolah dengan program fotosop dan hasil pengolahan dibahas nilai bp band secara diskriptif. Data kromatogram sekuensing diolah dengan program MEGA dan kemudian dilakukan blast homologi secara online ke data base gen bank NCBI, hasil pengolahan tersebut dibahas nilai kekerabatannya pada filogenetik tree secara diskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Samplng Sediman Mangrove.

Hasil pengamatan terhadap vegetasi mangrove di lokasi penelitian Karimunjawa – Kabupaten Jepara ditemukan 8 jenis mangrove yang menyusun populasi hutan mangrove. Kondisi ekosistem mangrove di TNKJ masih tergolong cukup baik, terutama di Pulau Kemujan yang memiliki hutan mangrove paling luas di Kepulauan Karimunjawa. Kondisi hutan mangrove di Pulau Kemujan yang luas dan masih alami, merupakan potensi yang sangat besar untuk dijadikan sebagai kawasan ekowisata mangrove, contohnya Tracking Mangrove.

Isolasi, Inokulasi dan Purifikasi Bakteri Sedimen Mangrove.

Terdapat 56 isolat yang telah berhasil dilakukan pemurnian. Sebanyak 56 isolat tersebut memiliki tipe morfologi koloni yang berbeda. Hal tersebut membuktikan bahwa ekosistem mangrove kaya akan mikroorganisme. Ekosistem mangrove memiliki produktivitas yang tinggi, dan oleh karenanya mampu menopang keanekaragaman jenis yang tinggi. Daun mangrove yang berguguran akan dimanfaatkan oleh fungi, protozoa dan bakteri serta diuraikan menjadi komponen bahan-bahan organik yang lebih sederhana. Jumlah jenis bakteri berubah dari satu waktu ke waktu berikutnya karena daya tahan hidup dan perkembangan bakteri dipengaruhi oleh kelembaban, suhu dan cahaya matahari.

Uji aktivitas proteolitik dengan metode divusi agar secara kualitatif dan kuantitatif.

Hasil isolai sebanyak 56 isolat memiliki aktifitas proteolitik yang berbeda berdasarkan data diameter zona bening. Protoase ekstraseluler sebagian besar berperan dalam hidrolisis substrat polipeptida besar. Media isolasi dan seleksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah susu skim. Susu skim adalah media yang sesuai untuk pertumbuhan mikroba karena kaya akan nutrien.



Gambar 2. Purifikasi bakteri yang aktif protease



Gambar 3. Uji aktivitas protease dengan metode divusi agar

Kasein merupakan protein susu yang terdiri dari fosfoprotein yang berkaitan dengan kalsium membentuk garam kalsium yang disebut kalsium kalseinat. Molekul ini sangat besar dan tidak larut dalam air serta membentuk koloid. Suspensi ini berwarna putih dan dapat diamati secara langsung pada saat disuspensikan kedalam kultur media padat. Dengan adanya enzim proteolitik ekstraseluler bakteri, kasein ini akan terhidrolisis menjadi peptida-peptida dan asam-asam amino yang larut. Hilangnya partikel kasein di dalam media susu skim ditandai dengan adanya zona lisis (zona jernih) di sekitar koloni bakteri, merupakan indikator bahwa 56 isolat bakteri-bakteri ini mampu merombak kasein dalam media susu skim.

Aktivitas hidrolisis secara kualitatif merupakan gambaran dari kemampuan isolat bakteri proteolitik merombak protein dengan membandingkan besarnya zona jernih di sekitar koloni dengan besarnya diameter koloni. Hasil perombakan polimer protein hanya ditunjukkan dengan adanya zona jernih yang menandakan protein telah dirombak menjadi senyawa peptida dan asam amino yang sifatnya terlarut dalam medium. Hal tersebut dapat dilihat pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Sepuluh isolat dengan zona aktivitas protease terbaik

Isolat	Zona Aktivitas (mm)			
	U1	U2	U3	$\bar{x} \pm sd$
2	28,5	27,0	27,5	$27,67 \pm 0,76$ ^{ab}
3	26,8	25,0	25,5	$25,78 \pm 0,93$ ^a
14	29,7	26,3	26,8	$27,60 \pm 1,81$ ^{ab}
16	26,3	25,3	25,7	$25,76 \pm 0,47$ ^a
17	32,9	29,3	29,8	$30,67 \pm 1,90$ ^b
30	38,8	39,4	43,7	$40,63 \pm 2,64$ ^c
31	25,2	25,6	26,1	$25,63 \pm 0,46$ ^a
44	29,2	26,8	27,3	$27,77 \pm 1,22$ ^{ab}
47	25,4	26,4	25,0	$25,59 \pm 0,69$ ^a
54	29,8	26,6	27,1	$27,82 \pm 1,70$ ^{ab}

Enzim protease mempunyai dua pengertian, yaitu proteinase yang mengkatalisis hidrolisis molekul protein menjadi fragmen-fragmen yang lebih sederhana, dan peptidase yang menhidrolisis fragmen polipeptida menjadi asam amino. Enzim proteolitik yang berasal dari mikroorganisme adalah protease yang mengandung proteinase dan peptidase.

Uji antagonistik isolat terseleksi.

Isolat bakteri hasil seleksi untuk pembentukan konsorsium lebih lanjut dilakukan uji antagonis antar isolat.

Hasil uji antagonis antar 10 isolat terbaik ditunjukkan pada Tabel 3. Berdasarkan hasil uji antagonis menunjukkan bahwa tidak terdapat satupun hasil uji yang antagonis sehingga mempunyai potensi untuk dikembangkan sebagai konsorsium probiotik. Konsorsium probiotik adalah campuran dari berbagai jenis atau strain bakteri yang mempunyai kemampuan

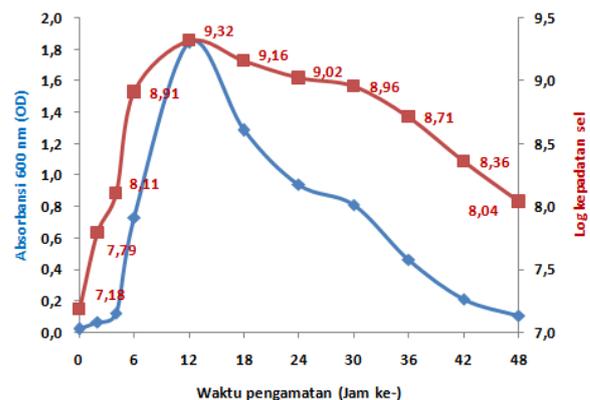
yang sama atau saling melengkapi atau saling menguatkan untuk melakukan fungsi probiotik.

Tabel 2. Uji antagonistik antar isolat terseleksi

	2	3	14	16	17	30	31	44	47	54
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Uji Kinetika Pertumbuhan Bakteri Pada Media Fermentor

Berdasarkan hasil uji antagonis menunjukkan bahwa semua isolat bersifat saling non-antagonis. Sehingga tahap selanjutnya adalah dilakukan uji kinetika pertumbuhan bakteri. Berdasarkan kurva pertumbuhan sel menunjukkan berpola polinomial, yaitu semakin lama masa inkubasi maka nilai kepadatan bakteri akan semakin tinggi sampai mencapai titik stasioner. Fase pertumbuhan bakteri terdiri dari fase penyesuaian, fase eksponensial, fase stasioner dan fase kematian. Pada fase adaptasi mikroba mengalami suatu masa dimana selnya menjadi lebih besar tetapi jumlahnya tetap sama atau sedikit sekali terjadi perkembangan populasi meskipun metabolisme sel terus berlangsung. Hal tersebut dapat dilihat pada **Gambar 4**.



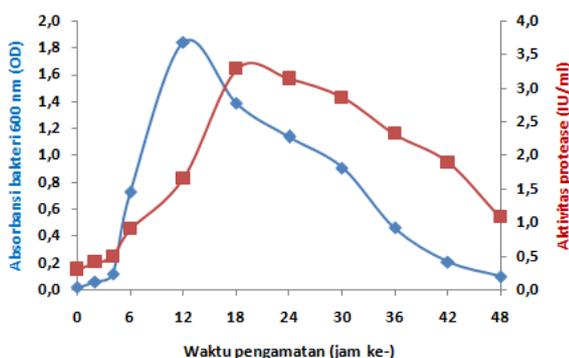
Gambar 4. Kurva pertumbuhan bakteri isolat 30

Fase lag yang ditandai dengan terus membelahnya sel mikroba. Selama fase log, sel membelah terus menerus konstan dengan kecepatan pertumbuhan yang tinggi saat angka dan log dari angka kelompok sel terhadap waktu pada garis lurus. Pada akhir fase log banyak sel akan mati, sedangkan yang masih ada sudah tidak mampu lagi mengadakan pembelahan.

Habisnya nutrisi dan akumulasi produk inhibitor seperti asam adalah beberapa faktor yang mempengaruhi kematian sel. Selain dapat mengetahui waktu dan umur kultur mikroba yang akan dipanen, kurva pertumbuhan pun dapat menentukan lamanya waktu generasi mikroba. Dengan mengetahui waktu generasi setiap mikroba maka dapat diprediksi populasi setiap mikroba dalam jangka waktu yang sama serta keaktifannya dalam proses metabolisme.

Uji kinetika protease isolat bakteri 30 di dalam media fermentor.

Sintesis protease ekstraseluler biasanya terjadi pada fase diam (stasioner), hal ini terkait dengan mekanisme represi katabolit. Selama fase pertumbuhan eksponensial, sel akan mengalami hambatan represi katabolit, sehingga menurunkan konsentrasi cAMP intraseluler yang dapat mengaktifkan transkripsi mRNA penyandi protease. Memasuki fase stasioner, represi katabolit mulai menurun sehingga mengaktifkan biosintesis enzim.



Gambar 5. Kurva aktivitas protease bakteri isolat 30

Pada genus *Bacillus*, sintesis enzim ekstraseluler dalam jumlah terbesar secara normal terjadi pada saat sebelum sporulasi, yaitu pada akhir fase eksponensial atau awal stasioner. *B. Subtilis* galur 38 semua sel bakteri muncul dalam bentuk sel vegetatif selama 12 jam pertama, kemudian terbentuk spora antara 16 dan 24 jam periode inkubasi. Hasil ini mengindikasikan bahwa produksi tertinggi protease dicapai selama fase eksponensial dan berlangsung konstan saat spora telah terbentuk (fase stasioner). Produksi protease pada akhir fase eksponensial atau

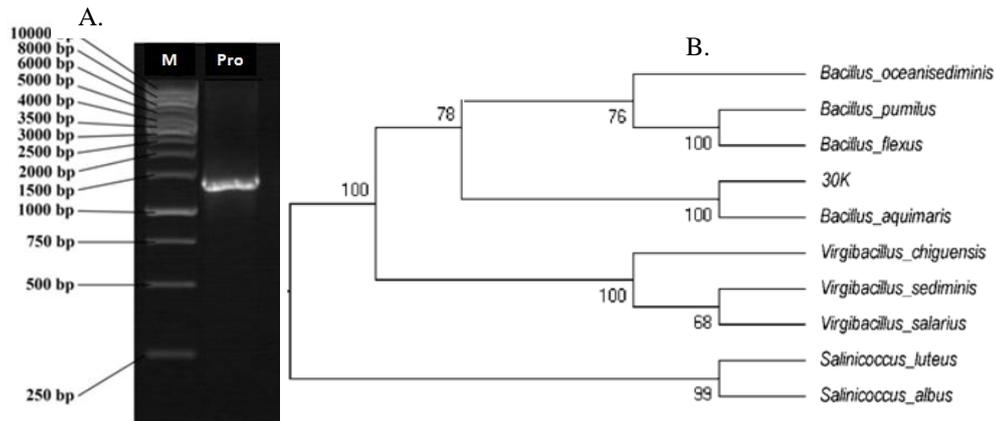
awal fase stasioner. Penurunan aktivitas protease dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya pH, suhu dan waktu inkubasi. Dalam suatu reaksi enzimatik, setelah suhu optimal tercapai laju reaksi akan turun.

Identifikasi genotipik (16 S-rRNA).

Hasil penelusuran menunjukkan bahwa isolat 30 memiliki homologi sebesar 97% dengan bakteri *Bacillus aquimaris* yang di temukan dalam penelitian Jung-Hoon et al., 2003 pada sampel air laut, Korea.

Analisis gen penyandi 16S rRNA dapat sebagai penanda molekuler karena bersifat unik dengan fungsi yang identik pada semua bakteri. Gen 16S rRNA memiliki beberapa daerah dengan urutan basa yang konservatif dan juga daerah yang urutan basanya yang sangat variatif. Perbandingan urutan basa yang konservatif berguna untuk mengkonstruksi pohon filogenetik universal, sedangkan urutan basa yang variatif dapat digunakan untuk melacak keragaman dan menempatkan strain-strain dalam satu spesies.

Isolat 30 dilakukan identifikasi secara genotipik. Hasil amplifikasi menunjukkan bahwa isolat 30 menghasilkan single band (pita tunggal) dengan ukuran sekitar 1.300 bp (base pair) sesuai dengan pembandingan menggunakan marker (penanda) DNA. Aplikasi teknik molekuler untuk menganalisis keragaman mikroba, seperti analisis gen 16S-rRNA dengan Polymerase Chain Reaction (PCR) mampu menampilkan keragaman genetika mikroba, baik yang dapat dikulturkan maupun tidak. Gen 16S-rRNA merupakan pilihan karena gen ini terdapat pada semua prokariota dan memiliki bagian atau sekuens konservatif dan sekuens lainnya yang sangat bervariasi. Penggunaan gen 16S rRNA telah digunakan sebagai parameter sistematik molekuler yang universal, representatif, dan praktis untuk mengkonstruksi kekerabatan filogenetik pada tingkat spesies. Analisis keragaman genetika yang cepat dan sederhana, untuk menelaah profil DNA gen 16S-rRNA hasil amplifikasi dengan PCR dapat dilakukan dengan teknik amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). Analisis ini dilakukan dengan cara mengamplifikasi gen 16SrRNA dengan primer yang disesuaikan dengan sampel DNA yang akan diamplifikasi.



Gambar 6. A. Gel doc hasil PCR dan elektroforesis; B. Filogenetik tree isolat 30

SIMPULAN DAN SARAN

1. Karimun Jawa – Kabupaten Jepara ditemukan 8 jenis mangrove yang menyusun populasi hutan mangrove. Jenis – jenis tersebut adalah *A. alba*, *Avicennia marina*, *R mucronata*, *Sonneratia caeseolaris*, *Rhizophora apiculata*, *Nypa fruticans*, *Bruguiera cylindrical* dan *Aegiceras corniculatum*.
2. Hasil isolasi, inokulasi dan purifikasi bakteri yang memiliki aktivitas proteolitik didapatkan sebanyak 56 isolat. Nilai diameter uji aktivitas proteolitik diperoleh berkisar 12,07 – 40,63 mm. Tiga isolat mempunyai aktivitas paling tinggi adalah isolat 44, isolat 17 dan isolat 30 yaitu sebesar 27,77^{ab}; 30,67^b dan 40,63^c.
3. Hasil uji antagonis menunjukkan bahwa 10 isolat terbaik saling tidak antagonis.
4. Hasil pengamatan OD isolat 30 menunjukkan bahwa fase lag terjadi pada jam ke-0 hingga ke-4 jam pertama. Fase logaritmik (eksponensial) terjadi pada jam ke-4 hingga ke-12 jam. Selanjutnya pada jam ke-12 hingga jam ke-42 bakteri mengalami fase penurunan yaitu kematian. Bakteri memiliki nilai jumlah generasi sebesar 7,113; waktu generasi sebesar 1,686 jam dan laju pertumbuhan bakteri sebesar 0,410 jam⁻¹.
5. Hasil pengamatan aktivitas protease bakteri menunjukkan bahwa jam ke-0 hingga ke-6 jam merupakan fase aktivitas protease awal. Pada waktu inkubasi ke-6 hingga ke-18 jam merupakan fase aktivitas protease eksponensial. Pada jam ke-24 hingga akhir waktu pertumbuhan jam ke-48, aktivitas protease bakteri mengalami fase penurunan. Bakteri memiliki nilai aktivitas spesifik sebesar 122,4 IU/mg; total aktivitas protease sebesar 2307,3 IU dan aktivitas protease sebesar 3,296 IU/ml.
6. Hasil amplifikasi dan visualisasi dengan gel dox menunjukkan bahwa isolat 30 menghasilkan *single band* (pita tunggal) dengan ukuran sekitar 1.300 bp (*base pair*).

7. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa isolat 30 memiliki homologi sebesar 97% dengan bakteri *Bacillus aquimaris* yang di temukan dalam penelitian Jung-Hoon *et al.*, 2003 pada sampel air laut, Korea.

DAFTAR PUSTAKA

- Annalalai, N., A. Kumar., A. Savanakumar., A. Vijajlakshmi., T. Balasubramanian., 2011, Characterization of Protease from *Algaligens faecalis* and Its antibacterial Activity on Fish Pathogens, *J. Environ. Biol*, 32: 781-786.
- Bairagi, A., K. Ghosh., S. Kumarsen., A. K. Ray., 2002, Enzyme Producing Bacterial Flora Isolated From Fish Digestive Tracts, *Aquaculture International*, 10 : 109-121.
- Gram, L., J. Melchiorson., B. Spanggaard., I. Huber., T. F. Nielsen., 1999, Inhibition of *Vibrio anguillarum* AH 2 a Possible Probiotic Treatment of fish, *Appl. Environ Microbiol*, 65 : 969-973.
- Isnansetyo, A., 2009, *Uji Antagonistik Langsung, Suatu Metode Baru Seleksi Bakteri Penghasil Antibiotik dan Penerapannya Untuk Seleksi Probiotik*. Pros, Seminar Nasional Penyakit Ikan dan Udang, Unsoed, Purwokerto.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W., 2000, Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64 : 655-671.
- Zhou, X., Y. Wang., W. Li., 2009, Effect of Probiotic on Larvae Shrimp (*Penaeus vannamei*) Based on Water Quality, Survival Rate

