

OPTIMASI pH DAN SALINITAS MEDIA KULTUR TERHADAP PERTUMBUHAN DAN AKTIVITAS PROTEASE EKTRASELULER BAKTERI *Bacillus firmus* DARI EKOSISTEM PADANG LAMUN NUSA LEMBONGAN BALI

OPTIMIZATION OF pH AND SALINITY OF CULTURE MEDIA ON GROWTH AND ACTIVITY OF EXTRACELLULAR PROTEASE BACTERIA *Bacillus firmus* FROM THE SEAGRASS PADANG ECOSYSTEM NUSA LEMBONGAN BALI

Muhammad Zainuddin^{1,2}, Delianis Pringgenies^{3,*}, Ocky Karna Radjasa⁴, Haeruddin⁵, Aninditia Sabdaningsih¹, dan Vivi Endar Herawati⁶

¹Program Doktor Manajemen Sumber Daya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro

²Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Nahdlatul Ulama Jepara

Jl. Taman Siswa, Tahunan, Jepara, Jawa Tengah 59451 Indonesia

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

⁴Badan Riset dan Inovasi Nasional, Indonesia

Gedung B.J. Habibie, Jl. M.H. Thamrin No. 8, Jakarta Pusat 10340 Indonesia

⁵Departemen Manajemen Sumber Daya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro

⁶Departemen Budidaya Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro

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

Email: pringgenies@yahoo.com

ABSTRAK

Spons merupakan organisme porifera yang hidup di dasar perairan. Spons memiliki hubungan simbiotik dengan bakteri. *Chalinula pseudomolitba* merupakan jenis spons yang hidup di perairan Nusa Lembongan Bali dan memiliki bakteri simbiosis *Bacillus firmus*. *Bacillus firmus* memiliki aktivitas proteolitik dengan menghasilkan enzim protease ekstraseluler. Bakteri ini memiliki potensi untuk dikembangkan menjadi probiotik dalam meremediasi protein pada limbah organik sisa pakan tambak budidaya udang. Dalam upaya produksi bakteri *Bacillus firmus* untuk probiotik maka diperlukan optimasi pH dan salinitas media kultur. Tujuan dari penelitian ini adalah melakukan optimasi pH dan salinitas media kultur bakteri *Bacillus firmus* dari simbiosis sponge *Chalinula pseudomolitba* yang memiliki aktivitas proteolitik. Penelitian menggunakan metode eksperimen aboratoris. Penelitian telah berhasil melakukan uji optimasi pH dan salinitas media kultur terhadap pertumbuhan dan aktivitas enzim protease ekstraseluler bakteri. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri *Bacillus firmus* memiliki laju pertumbuhan dan aktivitas protease terbaik pada kondisi kultur dengan pH 8 yaitu dengan nilai sebesar 0,174 dan 31,763 IU/ml. Selain itu juga memiliki laju pertumbuhan dan aktivitas protease terbaik pada salinitas media 30 ppt dengan nilai sebesar 0,186 dan 35,278 IU/ml.

Kata kunci : bakteri, simbiosis, spons, pertumbuhan, protease

ABSTRACT

Sponges are sponges that live on the bottom of the water. Sponges have a symbiotic relationship with bacteria. *Chalinula pseudomolitba* is a type of sponge that lives in the waters of Nusa Lembongan Bali and has the symbiotic bacterium *Bacillus firmus*. *Bacillus firmus* has proteolytic activity by producing extracellular protease enzymes. These bacteria have the potential to be developed into probiotics in remediating protein in organic waste left over from shrimp pond feed. In an effort to produce *Bacillus firmus*

bacteria for probiotics, it is necessary to optimize the pH and salinity of the culture media. The purpose of this study was to optimize the pH and salinity of *Bacillus firmus* bacterial culture media from the symbiont sponge *Chalinula pseudomolitba* which has proteolytic activity. The research used laboratory experimental method. Research has succeeded in conducting tests to optimize pH and salinity of culture media on the growth and activity of extracellular protease enzymes in bacteria. The results showed that *Bacillus firmus* had the best growth rate and protease activity under culture conditions with a pH of 8 with values of 0,174 and 31,763 IU/ml, respectively. In addition, it also has the best growth rate and protease activity at media salinity of 30 ppt with values of 0,186 and 35,278 IU/ml.

Keywords: bacteria, symbionts, sponges, growth, proteases

PENDAHULUAN

Ekosistem lamun memiliki organisme asosiatif benthik seperti spons. Spons sebagai organisme sederhana memiliki mekanisme pertahanan diri dan adaptasi terhadap perubahan lingkungan antara lain dengan menghasilkan senyawa metabolit sekunder. Spons memiliki hubungan simbiotik dengan bakteri. Hubungan ini mencakup membantu pertahanan kimiawi, fiksasi nitrogen, fotosintesis dan penyediaan nutrisi dengan membantu translokasi metabolisme termasuk nitrifikasi. Karena peranan ini bakteri yang bersimbiosis dengan spons memiliki aktivitas menghasilkan enzim ekstraseluler protease. 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.

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 untuk pertumbuhan dan menghasilkan produk samping senyawa amonia dan nitrit yang bersifat racun bagi udang (El-Saadony et al., 2021). Limbah organik pakan ini harus didekomposisi agar tidak merusak kualitas media budidaya udang (Holt et al., 2019). Proses dekomposisi dilakukan oleh bakteri penghasil enzim protease ekstraseluler. 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. Dalam upaya tersebut maka diperlukan teknologi kultur yang optimal guna mendapatkan biomassa sel yang tinggi untuk aplikasi.

Upaya peningkatan produksi biomassa sel memerlukan serangkaian optimasi dalam kultur, diantaranya adalah optimasi kondisi kultur. Optimasi kondisi kultur merupakan faktor penting yang mempengaruhi pertumbuhan dan biomassa sel bakteri (Oh et al., 2007; Zárate-Chaves et al., 2013). Suhu dalam kondisi kultur mempengaruhi pertumbuhan sel, sedangkan pH media kultur mempengaruhi produksi enzim (Rashmi et al., 2017). Penelitian ini memiliki tujuan mendapatkan kondisi optimal dalam kultur bakteri *Bacillus firmus* untuk produksi biomassa bakteri. Optimasi kondisi kultur tersebut meliputi suhu, pH, salinitas dan agitasi.

MATERI DAN METODE

Materi dalam penelitian ini adalah isolat bakteri *Bacillus firmus*. Bakteri *Bacillus firmus* yang bersimbiosis dengan sponge *Chalinula pseudomolitba* (Gambar 1). 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 (Pringgienies 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. Selanjutnya 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; Pringgienies et al., 2020).

Optimasi pH

Medium zobell 2216E cair ditambah substrat susu skim, ko-substrat karbon dan nitrogen dengan konsentrasi optimum yang diperoleh dari eksperimen sebelumnya. Selanjutnya ditambahkan starter isolat yang memberikan OD 0,01 pada A_{600} . pH medium diatur pada variasi 6, 7 dan 8 dengan penambahan larutan HCl 1N atau NaOH 1N. Salinitas 30 ppt dan 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 (Avcioglu et al., 2021)/

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. 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 (μ) bakteri.

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 10 menit pada suhu 37 °C. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit. Pada 1 ml supernatan di tambahkan Na_2CO_3 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 TAP (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. Selanjutnya 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).

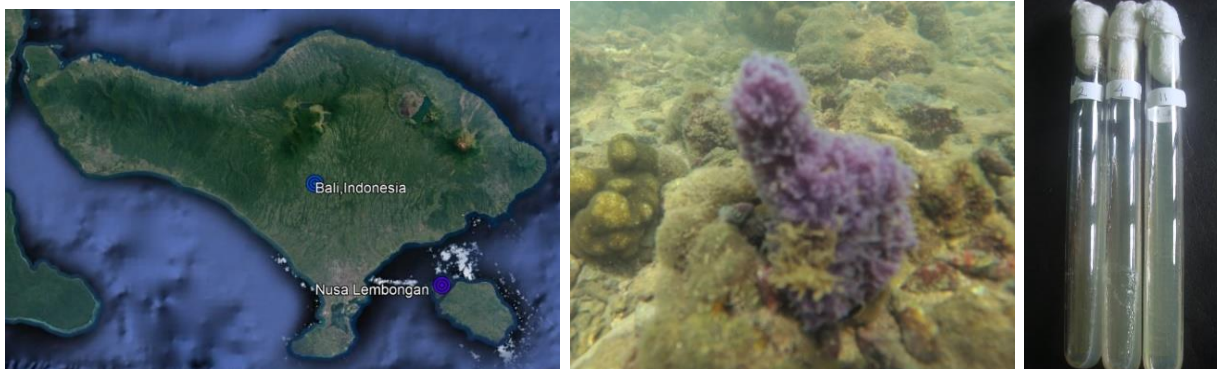
Optimasi Salinitas

Medium zobell 2216E cair ditambah substrat susu skim dan ko-substrat dengan konsentrasi optimum, diinokulasi dengan starter isolat yang memberikan OD 0,01 pada A_{600} . pH media diatur pada pH optimum sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya. Salinitas medium diatur pada variasi 15 ‰, 20 ‰, 25 ‰ dan 30 ‰. Kultur diinkubasi 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 (Kopperi et al., 2021).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimasi pH

Optimasi pH dilakukan terhadap perbedaan level yaitu pH 6, pH 7 dan pH 8. Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan



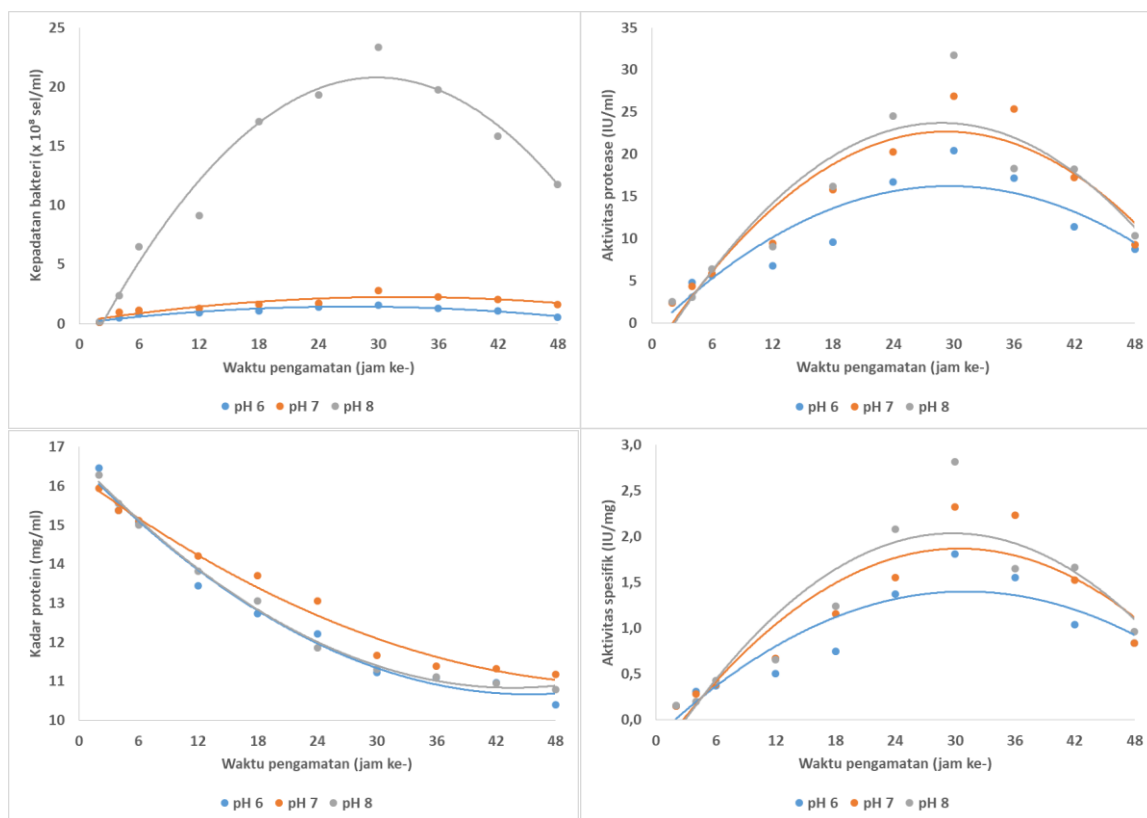
Gambar 1. Lokasi sampling, sampel sponge dan isolat bakteri *Bacillus firmus*

bahwa perlakuan optimasi pH berpengaruh signifikan ($\alpha < 0,05$) terhadap pertumbuhan bakteri *Bacillus firmus*. Pengaruh perlakuan perbedaan pH terhadap respon pola polynomial pertumbuhan bakteri dari yang terendah ke tertinggi secara berurutan adalah pH 6, pH 7 dan pH 8 dengan nilai kepadatan bakteri pada puncak polynomial sebesar 1,557; 2,815 dan 23,361 $\times 10^8$ sel/ml (Gambar 2). Perlakuan pH 8 adalah yang terbaik terhadap pertumbuhan dengan pola polynomial $y = -0,0274x^2 + 1,6332x - 3,5799$; $R^2 = 0,9667$; $R = 0,983$.

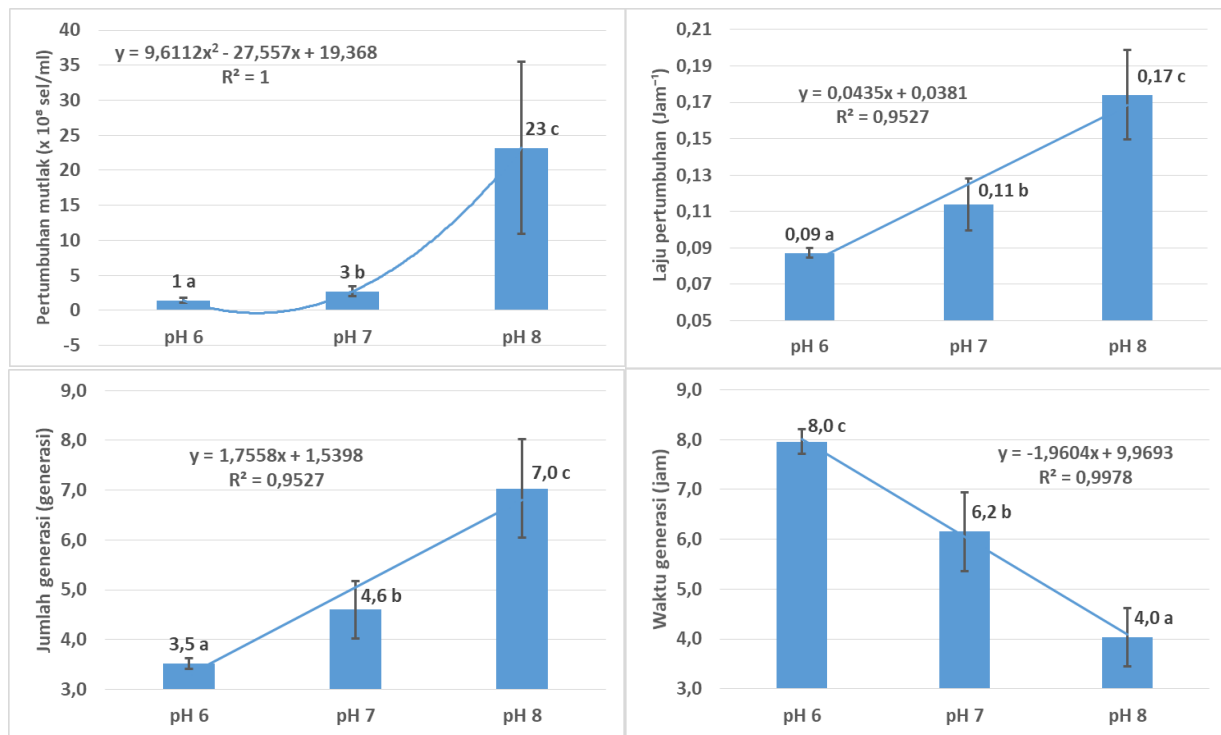
Perlakuan perbedaan pH berpengaruh signifikan terhadap pertumbuhan mutlak, laju pertumbuhan, jumlah generasi dan waktu generasi bakteri. Nilai pertumbuhan mutlak bakteri secara berurutan dari terendah ke tertinggi adalah pH 6, pH 7 dan pH 8 dengan nilai 1,422 a, 2,699 b dan 23,190 c $\times 10^8$ sel/ml (Gamabr 3). Nilai laju pertumbuhan bakteri secara berurutan dari terendah ke tertinggi adalah pH 6, pH 7 dan pH 8 dengan nilai 0,087 a, 0,113 b dan 0,174 c. Nilai jumlah generasi secara berurutan dari terendah ke tertinggi adalah pH 6, pH 7 dan pH 8 dengan nilai 3,521 a, 4,599 b dan 7,032 c. Nilai waktu

generasi secara berurutan dari terendah ke tertinggi adalah pH 8, pH 7 dan pH 6 dengan nilai 4,035 a, 6,153 b dan 7,956 c.

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan perbedaan pH berpengaruh signifikan ($\alpha < 0,05$) terhadap aktivitas protease dan aktivitas spesifik protease bakteri *Bacillus firmus*. Pengaruh perbedaan pH terhadap respon pola polynomial aktivitas protease bakteri dari yang terendah ke tertinggi secara berurutan adalah pH 6, pH 7 dan pH 8 dengan nilai aktivitas protease pada puncak polynomial sebesar 20,429 a, 26,936 b dan 31,763 c IU/ml. Perlakuan pH 8 adalah yang terbaik terhadap aktivitas protease dengan pola polynomial $y = -0,0336x^2 + 1,9373x - 4,1803$; $R^2 = 0,8391$; $R = 0,916$. Pengaruh perbedaan pH terhadap respon pola polynomial kadar protein bakteri dari yang terendah ke tertinggi secara berurutan adalah pH 6, pH 8 dan pH 7 dengan nilai kadar protein pada inkubasi jam ke- 30 sebesar 11,232 a, 11,315 a dan 11,667 a mg/ml. Perlakuan pH 8 adalah yang terbaik terhadap kadar protein dengan pola polynomial $y = 0,0030x^2 - 0,2653x + 16,630$; $R^2 = 0,9956$; $R = 0,998$.



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



Gambar 3. Pengaruh perbedaan pH terhadap pertumbuhan mutlak, laju pertumbuhan, jumlah dan waktu generasi bakteri *Bacillus firmus*

Pengaruh perbedaan pH terhadap respon pola polynomial aktivitas spesifik protease bakteri dari yang terendah ke tertinggi secara berurutan adalah pH 6, pH 7 dan pH 8 dengan nilai aktivitas spesifik protease pada puncak polynomial sebesar 1,811 a, 2,325 b dan 2,817 c IU/mg. Perlakuan pH 8 adalah yang terbaik terhadap aktivitas spesifik protease dengan pola polynomial $y = -0,0028x^2 + 0,1682x - 0,4673$; $R^2 = 0,8224$; $R = 0,907$.

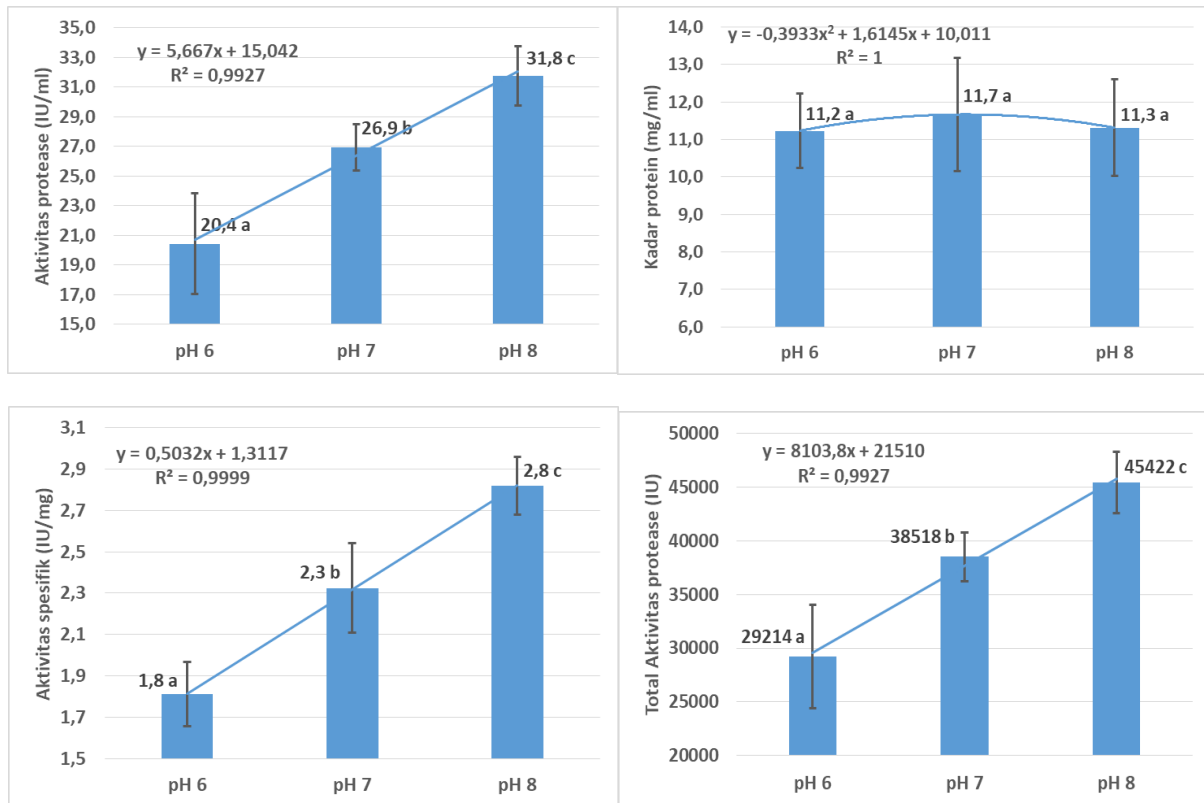
Berdasarkan penelitian perbedaan pH maka dapat disimpulkan bahwa perlakuan pH 8 adalah yang terbaik dalam kultur bakteri *Bacillus firmus*. pH lingkungan berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri. Sedang pH mempengaruhi kecepatan aktivitas enzim dalam mengkatalis suatu reaksi. Hal ini disebabkan konsentrasi ion hidrogen mempengaruhi struktur tiga dimensi enzim dan aktivitasnya. Setiap enzim memiliki pH optimum di mana pada pH tersebut struktur tiga dimensinya paling kondusif untuk mengikat substrat. Bila konsentrasi ion hidrogen berubah dari konsentrasi optimal, aktivitas enzim secara progresif hilang sampai pada akhirnya enzim menjadi tidak fungsional (Sun et al., 2020).

Optimasi salinitas

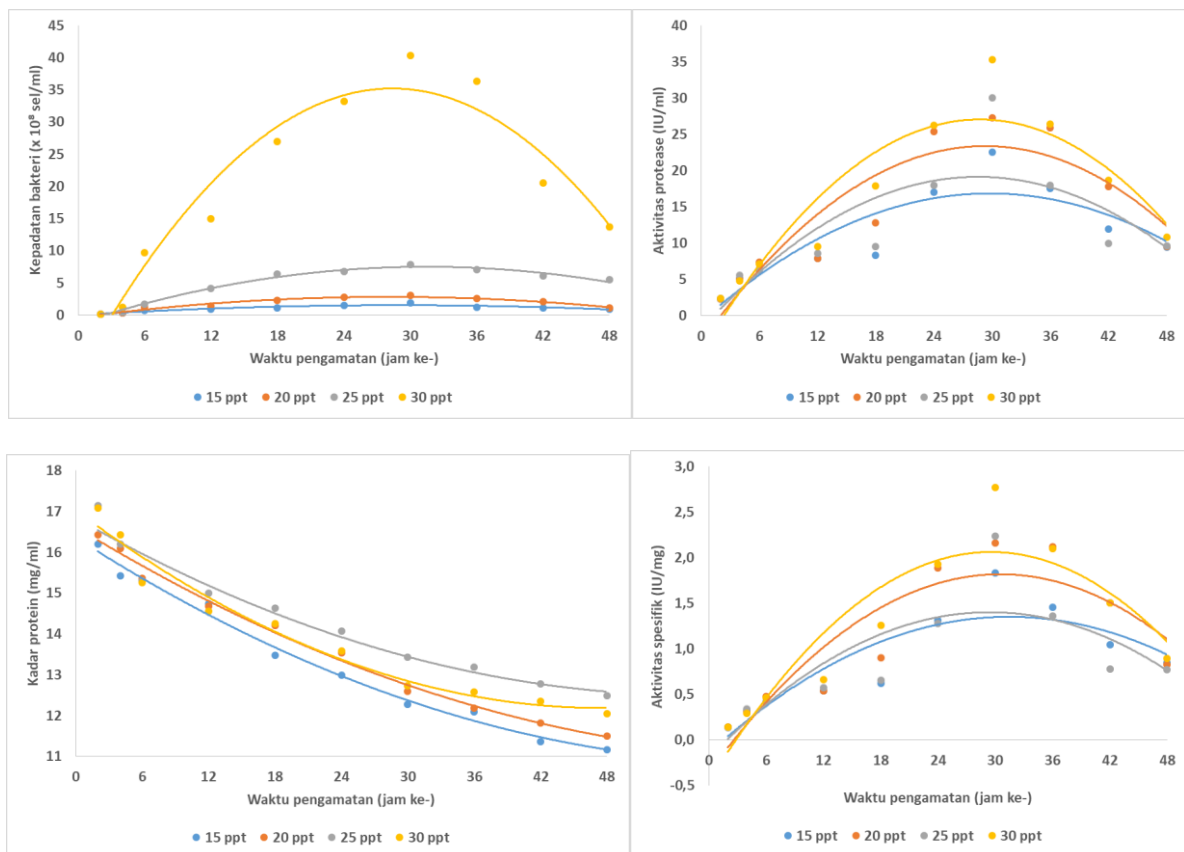
Optimasi salinitas dilakukan terhadap perbedaan level yaitu 15, 20, 25 dan 30 ppt. berdasarkan hasil penelitian menunjukkan

bahwa perlakuan optimasi salinitas berpengaruh signifikan ($\alpha < 0,05$) terhadap pertumbuhan bakteri *Bacillus firmus*. Pengaruh perlakuan perbedaan salinitas terhadap respon pola polynomial pertumbuhan bakteri (Gambar 5) dari yang terendah ke tertinggi secara berurutan adalah 15, 20, 25 dan 30 ppt dengan nilai kepadatan bakteri pada puncak polynomial sebesar 1,941; 3,109; 7,898 dan 40,327 $\times 10^8$ sel/ml. Perlakuan salinitas 30 ppt adalah yang terbaik terhadap pertumbuhan dengan pola polynomial $y = -0,0549x^2 + 3,1163x - 8,9856$; $R^2 = 0,9347$; $R = 0,967$.

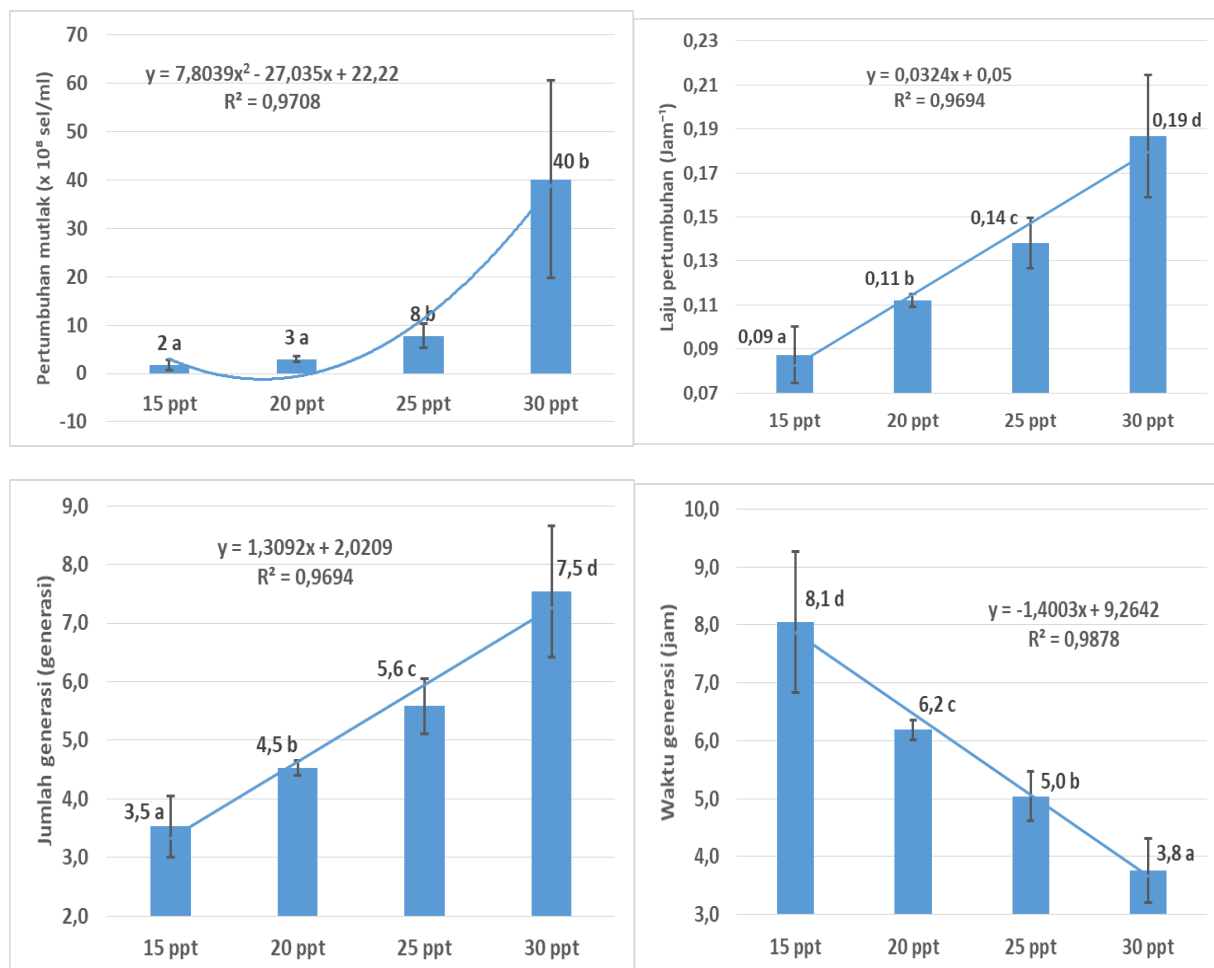
Perlakuan perbedaan salinitas berpengaruh signifikan terhadap pertumbuhan mutlak, laju pertumbuhan, jumlah generasi dan waktu generasi bakteri. Nilai pertumbuhan mutlak bakteri secara berurutan dari terendah ke tertinggi adalah salinitas 15, 20, 25 dan 30 ppt dengan nilai 1,786 a, 2,974 ab, 7,744 bc dan 40,147 c $\times 10^8$ sel/ml (Gambar 6). Nilai laju pertumbuhan bakteri secara berurutan dari terendah ke tertinggi adalah salinitas 15, 20, 25 dan 30 ppt dengan nilai 0,087 a, 0,111 b, 0,138 c dan 0,186 d. Nilai jumlah generasi secara berurutan dari terendah ke tertinggi adalah salinitas 15, 20, 25 dan 30 ppt dengan nilai 3,529 a, 4,524 b, 5,578 c dan 7,542 d. Nilai waktu generasi secara berurutan dari terendah ke tertinggi adalah salinitas 30, 25, 20 dan 15 ppt dengan nilai 3,767 a, 5,042 b, 6,191 c dan 8,052 d.



Gambar 4. Pengaruh perbedaan pH terhadap aktivitas protease, kadar protein, aktivitas spesifik dan total aktivitas protease bakteri *Bacillus firmus*



Gambar 5. Optimasi salinitas terhadap Polynomial pertumbuhan, aktivitas proteasen kadar protein dan aktivitas spesifik protease bakteri *Bacillus firmus*



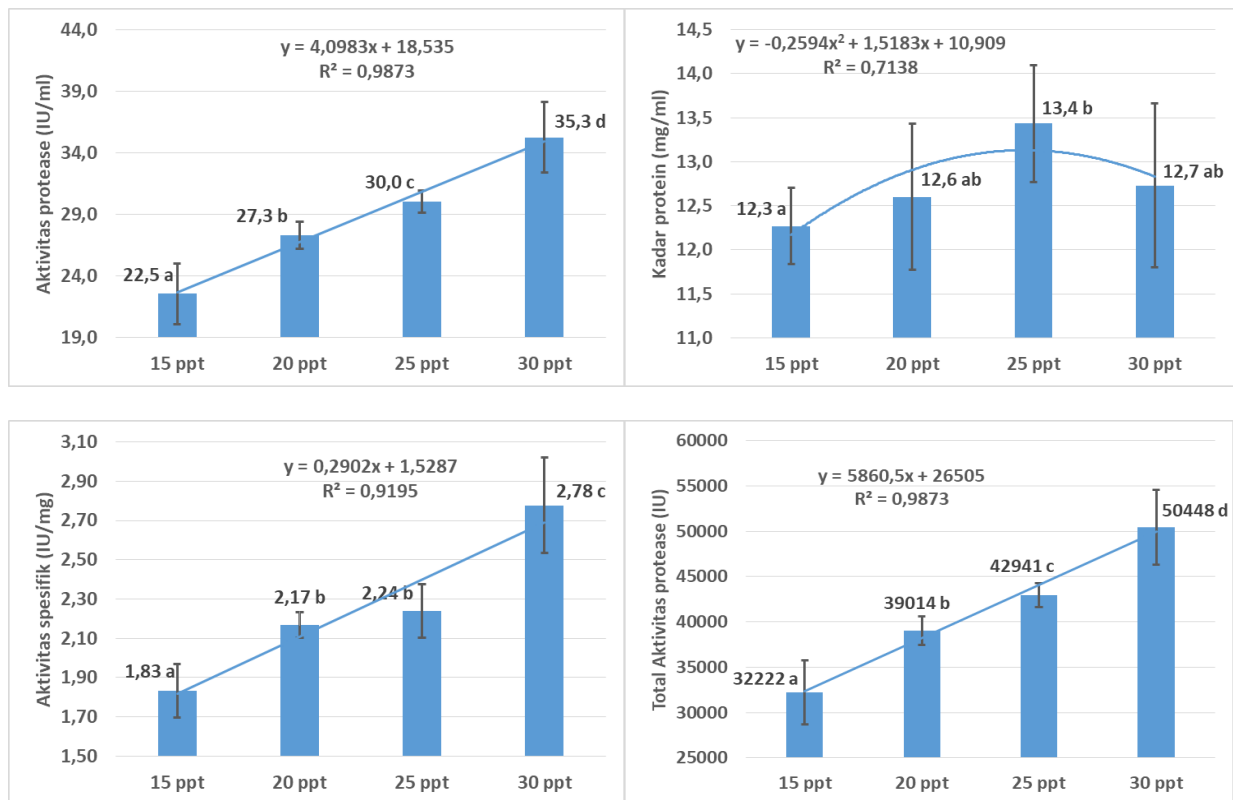
Gambar 6. Pengaruh perbedaan salinitas terhadap pertumbuhan mutlak, laju pertumbuhan, jumlah dan waktu generasi bakteri *Bacillus firmus*

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan perbedaan salinitas berpengaruh signifikan ($\alpha < 0,05$) terhadap aktivitas protease, kadar protein dan aktivitas spesifik protease bakteri *Bacillus firmus*. Pengaruh perbedaan salinitas terhadap respon pola polynomial aktivitas protease bakteri dari yang terendah ke tertinggi secara berurutan adalah salinitas 15, 20, 25 dan 30 ppt dengan nilai aktivitas protease pada puncak polynomial sebesar 22,532 a, 27,282 b, 30,028 c dan 35,278 d IU/ml (Gambar 7).

Perlakuan salinitas 30 ppt adalah yang terbaik terhadap aktivitas protease dengan pola polynomial $y = -0,0388x^2 + 2,2319x - 5,0285$; $R^2 = 0,8537$; $R = 0,924$. Pengaruh perbedaan salinitas terhadap respon pola polynomial kadar protein bakteri dari yang terendah ke tertinggi secara berurutan adalah salinitas 15, 20, 30 dan 25 ppt dengan nilai kadar protein pada inkubasi jam ke- 30 sebesar 12,269 a, 12,603 ab, 12,730 ab dan 13,433 b mg/ml. Perlakuan salinitas

30 ppt adalah yang terbaik terhadap kadar protein dengan pola polynomial $y = 0,0021x^2 - 0,2037x + 17,035$; $R^2 = 0,9682$; $R = 0,984$.

Pengaruh perbedaan salinitas terhadap respon pola polynomial aktivitas spesifik protease bakteri dari yang terendah ke tertinggi secara berurutan adalah salinitas 15, 20, 25 dan 30 ppt dengan nilai aktivitas spesifik protease pada puncak polynomial sebesar 1,833 a, 2,167 b, 2,239 b dan 2,776 c IU/mg. Perlakuan salinitas 30 ppt adalah yang terbaik terhadap aktivitas spesifik protease dengan pola polynomial $y = -0,0029x^2 + 0,1709x - 0,4610$; $R^2 = 0,8369$; $R = 0,915$. Berdasarkan penelitian perbedaan salinitas maka dapat disimpulkan bahwa perlakuan salinitas 30 ppt adalah yang terbaik dalam kultur bakteri *Bacillus firmus*. Mekanisme bakteri yang hidup pada salinitas tinggi akan beradaptasi dengan tekanan osmotik. Selain itu sel bakteri harus mempunyai komponen konsentrasi garam yang rendah dalam sitoplasmanya (Sabari et al., 2020).



Gambar 7. Pengaruh perbedaan salinitas terhadap aktivitas protease, kadar protein, aktivitas spesifik dan total aktivitas protease bakteri *Bacillus firmus*

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 pH 8 yaitu dengan nilai sebesar 0,174 c dan 31,763 c IU/ml. Serta pada kondisi salinitas media 30 ppt dengan nilai sebesar 0,186 d dan 35,278 d 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 dan BBPBAP Jepara.

REFERENSI

Avcioglu, N.H., Birben, M. & Bilkay, I.S. 2021. Optimization and physicochemical

characterization of enhanced microbial cellulose production with a new Kombucha consortium. *Process Biochemistry*, 108: 60-68.

- 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, May. Screening of extracellular enzyme from Phaeophyceae-associated fungi. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 750(1): p.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 & Shellfish Immunology*, 117:36-52.
- 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: p.107387.
- Kopperi, H., Amulya, K. & Mohan, S.V. 2021. Simultaneous biosynthesis of bacterial polyhydroxybutyrate (PHB) and extracellular polymeric substances (EPS): Process optimization and Scale-up. *Bioresource Technology*, 341: p.125735.

- 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(10-11):869-874.
- 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.
- 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): 102-112. DOI: 10.20473/jipk.v13i2.14725
- Rashmi, B.S. & Gayathri, D. 2017. Evaluation and Optimization of Extracellular Digestive Enzymes from *Bacillus* spp. Isolated from Curds. *Maternal and Pediatric Nutrition*, 3(118):2472-1182.
- Saberi, F., Marzban, R., Ardjmand, M., Shariati, F.P. & Tavakoli, O. 2020. Optimization of culture media to enhance the ability of local *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 19(7): 468-475. DOI: 10.1016/j.jssas.2020.08.004
- Setyati, W.A. 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): 242-252.
- 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
- Sun, F., Hu, Y., Yin, X., Kong, B. & Qin, L., 2020. Production, purification and biochemical characterization of the microbial protease produced by *Lactobacillus fermentum* R6 isolated from Harbin dry sausages. *Process Biochemistry*, 89:37-45. DOI: 10.1016/j.procbio.2019.10.029
- 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.
- 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: 215-223.