

Kinetika Pertumbuhan dan Aktivitas Protease Isolat 36k dari Sedimen Ekosistem Mangrove, Karimunjawa, Jepara

Wilis Ari Setyati^{1,2*}, Erni Martani², Triyanto², Subagiyo¹ dan Muhammad Zainuddin³

¹Program Studi Ilmu Kelautan Universitas Diponegoro

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

²Program Pasca Sarjana Program Studi Bioteknologi,

Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada. Bulaksumur, Yogyakarta 55281 Indonesia

³Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Nahdlatul Ulama Jepara

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

Email: wilisarsetyati@yahoo.co.id

Abstrak

Budidaya perikanan laut dan payau menghasilkan sejumlah besar limbah organik yang dibuang ke lingkungan sekitarnya. Sebagian besar limbah organik ini berasal dari sisa pakan, dan feses. Faktor yang menyebabkan terjadinya penurunan produksi budidaya udang adalah munculnya penyakit dan penurunan kualitas air yang dikarenakan adanya akumulasi bahan organik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kinetika pertumbuhan dan aktivitas protease bakteri sedimen mangrove dari Karimunjawa - Jepara yang berpotensi sebagai kandidat konsorsium probiotik dengan kemampuan aktifitas bioremediasi. Pertumbuhan bakteri isolat 36K memiliki Fase lag (adaptasi) pada waktu kultivasi jam ke-0 hingga jam ke-4. Sedangkan pada jam ke-6 hingga jam ke-30, isolat 36K telah memasuki fase logaritmik (eksponensial) yang dicirikan dengan adanya pertumbuhan yang signifikan. Pada waktu pertumbuhan jam ke-30 diperoleh nilai OD sebesar $1,939 \pm 0,0125$ dengan berat kering biomassa bakteri sebesar $1,325 \pm 0,043$ mg.ml⁻¹, laju pertumbuhan spesifik (μ) sebesar 0,1446 jam⁻¹, jumlah generasi 8,7609 dan waktu generasi 4,794 jam. Selanjutnya waktu pertumbuhan jam ke-36 hingga jam ke-42, sel isolat 36K mengalami fase pertumbuhan yang relatif tetap yaitu memasuki fase stasioner. Berikutnya adalah fase kematin pada jam ke-42 hingga jam ke-48, terjadi penurunan laju pertumbuhan yang disebabkan oleh kekurangan materi pertumbuhan seperti vitamin dan unsur mineral. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa kadar protein diawal sampai akhir penelitian mengalami penurunan sebesar 97,365%. Nilai laju penurunan kadar protein di media kultur bakteri adalah $0,255 \pm 0,005$ mg.ml⁻¹.jam⁻¹. Produksi enzim protease isolat 36K dilakukan ketika biakan berumur 2 jam hingga 6 jam dengan aktivitas optimum dicapai pada 6 jam masa inkubasi fase eksponensial pertumbuhan bakteri.

Kata kunci: sedimen, mangrove, bioremediasi, pertumbuhan, protease

Abstract

Growth kinetics and 36K Isolate Protease Activity of Mangrove Ecosystem Sediment Karimunjawa, Jepara

Marine and brackishwater culture produced large number of organic waste, mostly from leftover feed and faeces, which normally released to the nearby water system and becoming source of diseases and reducing water quality. The study was aimed to determine the growth kinetics and protease activity of 36k isolate from mangrove sediment of Karimunjawa, Jepara which possibly developed into probiotic consortium candidate with bioremediation activity capability. The study was able to describe the growth kinetics and protease activity of 36k isolate which has lag phase (adaptation) on the 0 to the first 4 hours. Meanwhile from 6th to 30th hours isolate 36k entering logarithmic phase (exponential) characterized by significant growth. At the 30th hours period the OD value was $1,939 \pm 0,0125$, bacterial biomass dry weight of $1,325 \pm 0,043$ mg.ml⁻¹, specific growth rate (μ) was 0,1446 hours, number of generation 8,7609 dan regeneration time of 4,794 hour. Between 36 to 42 hours the growth of 36k isolate cell was relatively no difference indicating the stationer phase has reached followed by mortality phase between the 42-48 hours where the growth rate was decline due to the limitation of growth material such as vitamins and minerals. The result also show that protein concentration was significantly decline up to 97,365%. The reduction of of protein content was $0,255 \pm 0,005$ mg.ml⁻¹.hour⁻¹. The production of enzyme

in cultured bacteria was conducted between first 2–6 hours and reach the optimum activity by 6 hours incubation i.e. at the exponential growth phase. The substrate consumption by 36K bacteria isolate was indicated by the decline of reduced sugar with average rate of substrate consumption of 2,0557 g.g⁻¹.

Keywords: sediment, mangrove, bioremediation, growth, protease

Pendahuluan

Budidaya perikanan laut dan payau menghasilkan sejumlah besar limbah organik yang dibuang ke lingkungan sekitarnya. Sebagian besar limbah organik ini berasal dari sisa pakan, dan atau feses (Qian *et al.*, 2001; Holmer *et al.*, 2007). Hasil penelitian Burford *et al.* (2003) pada tambak udang dengan sistim tanpa penggantian air menunjukkan kandungan bahan organik 2,29-5.56 mg.L⁻¹, N-anorganik 0,17-10,66 mg.L⁻¹ dan kandungan C-organik sebesar 14,20-48,10 mg.L⁻¹. Akumulasi bahan organik ini menjadi salah satu faktor utama kematian massal udang karena kandungan bahan organik yang tinggi akan memacu proses biodekomposisi, pertumbuhan mikroorganisme dan konsumsi oksigen (Avnimelech dan Ritvo, 2003).

Bahan organik tersebut akan terurai dan terbentuk amonia yang dapat terakumulasi pada lapisan substrat dasar tambak atau terlarut dalam air yang akan bersifat toksik terhadap udang. Maka perlu dilakukan upaya untuk mengendalikan kualitas air. Pendekatan yang paling efektif adalah melalui mikroorganisme yang dikembangkan untuk menyehatkan ekosistem tambak harus mempunyai fungsi membersihkan bahan organik (bioremediasi) (Kumar *et al.*, 2011; Sharma, 2012).

Berdasarkan karakteristik formula pakan udang, maka mikroorganisme yang akan efektif dalam melakukan bioremediasi tambak udang harus memiliki kemampuan mendegradasi komponen pakan terutama protein yaitu bakteri proteolitik. Bakteri proteolitik adalah bakteri yang mampu menghasilkan enzim proteolitik ekstraseluler yang berfungsi melakukan proses dekomposisi protein menjadi oligopeptida dan asam amino (Karigar dan Rao, 2011).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kinetika pertumbuhan dan aktivitas protease bakteri isolat 36K dari sedimen mangrove dari Karimunjawa, Kabupaten Jepara yang berpotensi sebagai kandidat konsorsium probiotik dengan kemampuan aktivitas bioremediasi.

Materi dan Metode

Penelitian ini menggunakan isolat 36K yang diisolasi dari sedimen ekosistem mangrove

Karimunjawa, Kabupaten Jepara. Media uji pertumbuhan menggunakan media Zobell 2216 E broth yang diperkaya dengan glukosa 2 % dan amonium nitrat 0,05%. Alat yang digunakan dalam uji pertumbuhan adalah fermentor Applikon ADI 1030 (*Biocontroller*) dan Spektrofotometer UV/Vis (Beckman). Secara keseluruhan penelitian akan dilakukan dalam beberapa tahap yaitu peremajaan isolat, penyegaran kultur, pengukuran turbiditas (OD), kadar biomassa, aktivitas protease, kadar protein, penetapan gula pereduksi.

Peremajaan isolat

Biakan murni disimpan dan diremajakan 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 (Setyati dan Subagiyo, 2012).

Penyegaran kultur

Penyegaran kultur dilakukan dengan mengambil kultur isolat 36K sebanyak 5 ml kemudian dimasukkan ke dalam 20 ml media Zobell 2216 E broth yang diperkaya dengan glukosa 2% dan amonium nitrat 0,05% divortex sampai homogen lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C (Yuliana, 2008).

Kultur di fermentor biocontroller

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 2216 E broth yang diperkaya dengan glukosa 2% dan amonium nitrat 0,05%, konsentrasi inokulum 1% dengan OD 0,01 pada A₆₀₀, pH 8, suhu 35°C, salinitas 30 ppt, kecepatan agitasi 150 rpm. Pengamatan dilakukan terhadap nilai optical density (OD) bakteri, biomassa kering bakteri, aktivitas protease, kadar protein, dan total gula reduksi (kadar glukosa) pada inkubasi 0, 2, 4, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, dan 48 jam (Annamalai *et al.*, 2011).

Pengukuran turbiditas bakteri

Pengukuran OD 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).

Pengukuran kadar biomassa bakteri

Pengukuran kadar biomassa bakteri dilakukan dengan cara sebanyak 20 ml sampel disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Natan yang didapatkan dilarutkan dengan PBS sebanyak 10 ml untuk membersihkan sel dari media. Setelah dilarutkan dalam PBS disentrifugasi ulang pada kondisi yang sama dengan sebelumnya. Endapan sel kemudian dipindahkan ke cawan porselin dan dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C sampai beratnya konstan. Kemudian cawan porselin berisikan sel kering dimasukkan segera ke dalam desikator, setelah dingin cawan porselin berisi sel kering ditimbang (Yuliana, 2008).

Pengukuran aktivitas enzim protease

Pengukuran aktivitas enzim dilakukan berdasarkan metoda Ward (2009) yang dimodifikasi. 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 Na₂CO₃ 0,5 M dan pereaksi folin ciocalteus (1:2), campuran diinkubasi 20 menit pada suhu 37°C. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 578 nm (Oke dan Onilude, 2014).

Pengukuran kadar protein

Kadar protein dalam media kultur diukur berdasarkan metode Lowry (Sugiyono, 2003), 1 ml sampel enzim ditambahkan 0,9 ml pereaksi Lowry A lalu dikocok dan didiamkan selama 15 menit. Tambahkan pereaksi Lowry B (folin ciocalteu) sebanyak 3 ml lalu dikocok dan didiamkan selama 30 menit. Lalu ditentukan absorbansi spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm.

Penetapan gula pereduksi

Sebanyak 1 ml sampel dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 3 ml pereaksi dinitrosalicylic acid (DNS). Larutan tersebut ditempatkan dalam air mendidih selama 5 menit. Biarkan sampai dingin pada suhu ruang. Ukur absorbansi pada panjang gelombang 550 nm.

Penetapan gula pereduksi ditentukan dengan mengkonversikan nilai absorbansi kedalam persamaan regresi linier sederhana kurva standar DNS. Kurva standar dibuat dengan mengukur nilai gula pereduksi pada selang konsentrasi 0,2-0,5 mg.L⁻¹ (Sugiyono, 2003).

Analisis data

Aktivitas spesifik protease (U.mg⁻¹) merupakan rasio dari aktivitas protease (U.ml⁻¹) terhadap kadar protein (mg.ml⁻¹) (Sugiyono, 2003). Data yang diperoleh dilakukan analisis secara diskriptif dan analisis *one way anova* dengan uji lanjut *Tukey P=0.05* menggunakan program SPSS 16.

Hasil dan Pembahasan

Hasil pengamatan OD dan Kurva pertumbuhan (Gambar 1A, 1B), menunjukkan bahwa isolat 36K mempunyai fase lag (adaptasi) relatif singkat. Fase ini diduga terjadi pada waktu pertumbuhan ke-0 hingga ke-4 jam pertama. Fase lag (adaptasi) relatif singkat karena bakteri tersebut tumbuh pada media yang sama dengan media penyegaran di tahap sebelumnya maka penyesuaian diri dengan lingkungan yang baru berlangsung cepat.

Mikrobia jika dipindahkan ke dalam suatu media, maka mula-mula bakteri tersebut akan mengalami fase lag (adaptasi) untuk menyesuaikan diri dengan kondisi lingkungan di sekitarnya (Middelbeek et al., 1992; Mangunwidjaja dan Suryani, 1994). Panjang atau pendeknya fase lag (adaptasi) sangat ditentukan oleh jumlah sel yang diinokulasikan, kondisi fisiologis dan morfologis bakteri, serta media kultivasi yang sesuai (Fardiaz, 1987; Scragg, 1991; Middelbeek et al., 1992). Jika isolat sering dilakukan peremajaan dan kultur pada media yang sama maka dapat saja bakteri tidak memerlukan fase lag (adaptasi) dalam upaya penyesuaian diri dengan lingkungannya. Jika media dan lingkungan pertumbuhan sama seperti media dan lingkungan sebelumnya, mungkin tidak diperlukan waktu adaptasi.

Kurva pertumbuhan juga menunjukkan bahwa pada jam ke-6 hingga ke-36 jam, isolat 36K telah memasuki fase logaritmik (eksponensial) yang dicirikan dengan adanya pertumbuhan yang signifikan. Namun demikian fase eksponensial isolat 36K berlangsung lama yaitu 30 jam. Pada waktu pertumbuhan jam ke-30 diperoleh nilai OD sebesar 1,939±0,0125 dengan berat kering biomassa bakteri sebesar 1,325±0,043 mg.ml⁻¹. Berdasarkan pola pertumbuhan, fase eksponensial pada bakteri

isolat 36K mempunyai nilai laju pertumbuhan spesifik (μ) sebesar $0,1446 \text{ jam}^{-1}$, jumlah generasi 8,7609 dan waktu generasi 4,794 jam. Nilai ini sesuai dengan penelitian Ghaly *et al.* (2003) yang menyatakan bahwa laju pertumbuhan bakteri yang diteliti adalah $0,14 \text{ jam}^{-1}$.

Wenge dan Methews (1999) menyatakan bahwa pertumbuhan dan metabolisme bakteri dipengaruhi oleh beberapa parameter seperti suhu, pH, kecepatan agitasi dan tingkat oksigen terlarut. Menurut Kosim dan Putra (2010) pada fase eksponensial bakteri mengalami pertumbuhan secara cepat. Selain itu, kebutuhan akan energi bagi bakteri pada fase eksponensial lebih tinggi dibandingkan pada fase lag (adaptasi), stasioner dan kematian. Fase eksponensial sel banyak menghasilkan zat-zat metabolit yang dibutuhkan dalam memenuhi kebutuhannya dalam rangka pertumbuhan.

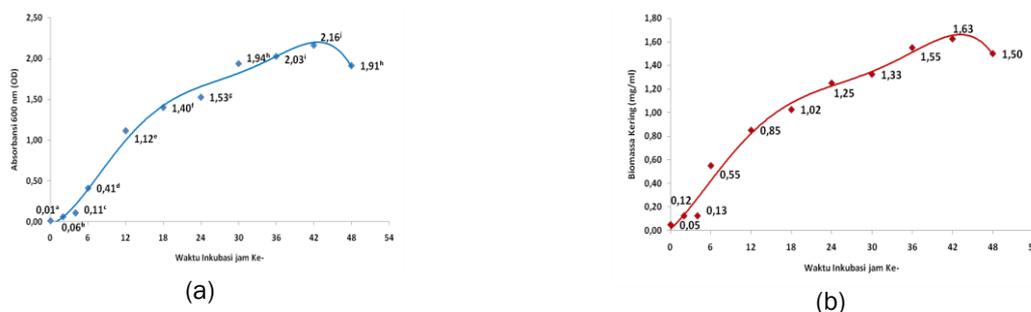
Pada fase eksponensial mikroba membelah dengan cepat dan konstan. Kecepatan pertumbuhan pada fase ini sangat dipengaruhi oleh media tempat tumbuhnya seperti pH dan kandungan nutrisi, juga kondisi lingkungan termasuk suhu dan kelembaban udara (Middelbeek *et al.*, 1992). Fase eksponensial adalah keadaan pertumbuhan yang cepat dengan laju pertumbuhan spesifik (μ) konstan, komposisi selular tetap, sedangkan komposisi kimiawi media biakan berubah akibat terjadinya sintesis produk dalam penggunaan substrat (Judoamidjojo, 1990). Selanjutnya waktu pertumbuhan ke-36 hingga akhir waktu pertumbuhan jam ke-42, sel isolat 36K mengalami fase pertumbuhan yang relatif tetap yaitu memasuki fase stasioner. Pada fase stasioner jumlah populasi sel tetap karena jumlah sel yang membelah sama dengan jumlah sel yang mati. Mangunwidjaja dan Suryani (1994) menyatakan bahwa ukuran sel pada fase stasioner menjadi lebih kecil-kecil karena sel tetap melakukan pembelahan meskipun zat-zat nutrisi media sudah mulai habis. Berikutnya adalah fase kematian, terjadi penurunan laju pertumbuhan yang disebabkan oleh kekurangan materi pertumbuhan seperti vitamin dan unsur mineral (Gaman dan Sherrington, 1994). Kematian

juga dapat disebabkan oleh berkurangnya beberapa nutrisi esensial dalam media atau karena terjadinya akumulasi autotoksin dalam media atau kombinasi dari keduanya.

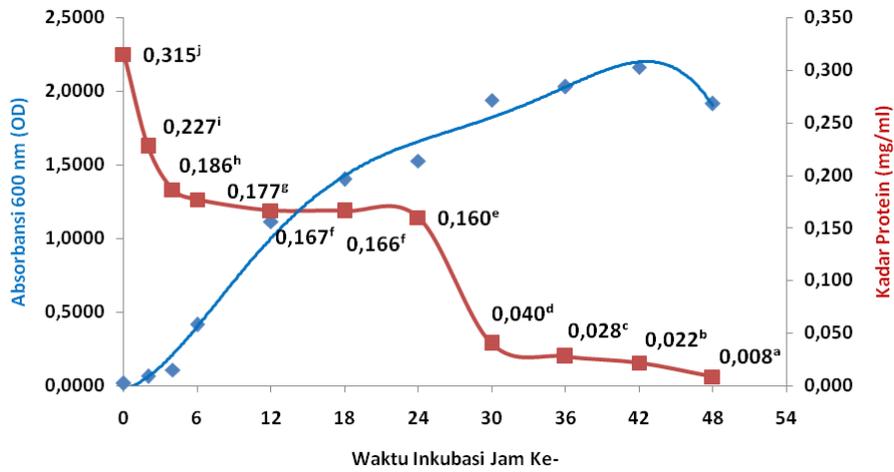
Hasil pengamatan kadar protein (Gambar 2.) menunjukkan bahwa kadar protein diawal sampai akhir penelitian mengalami penurunan sebesar 97,365%. Nilai laju penurunan kadar protein di media kultur bakteri adalah $0,255 \pm 0,005 \text{ mg.ml}^{-1}.\text{jam}^{-1}$. Berdasarkan grafik penurunan kadar protein terdapat dua kali penurunan secara drastis yaitu pada jam ke-0 hingga 6 jam mengalami penurunan sebesar 43,9 % dan pada jam ke-24 hingga 30 jam mengalami penurunan sebesar 75,1%. Diantara waktu tersebut terdapat masa stasioner penurunan kadar protein yaitu jam ke- 6 hingga 24 jam dengan nilai penurunan sebesar 9,54 %.

Produksi enzim protease isolat 36K (Gambar 3) dilakukan ketika biakan berumur 2 jam hingga 6 jam yaitu berada pada fase eksponensial pertumbuhan bakteri. Produksi protease isolat 36K meningkat saat mencapai fase eksponensial, dengan aktivitas optimum dicapai pada 6 jam masa inkubasi. Pola aktivitas protease yang fluktuatif dilaporkan dalam penelitian Mubarik dan Wirahadikusumah (1996). Berdasarkan kurva tumbuh *S. Marcescens* bahwa produksi enzim optimum terjadi pada saat sel berada dalam fase eksponensial atau biakan berumur 18 jam. Pada genus *Bacillus*, sintesis enzim ekstraseluler dalam jumlah terbesar dan secara normal terjadi pada saat sebelum sporulasi, yaitu pada fase eksponensial (Suhartono, 1997).

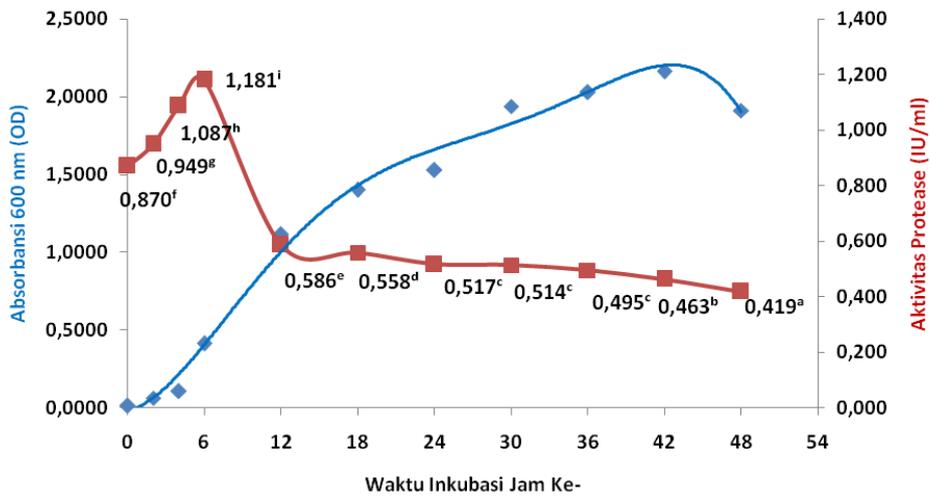
Chantawannakul *et al.* (2002) melaporkan bahwa *B. Subtilis* galur 38 muncul dalam bentuk sel vegetatif selama 12 jam pertama, kemudian terbentuk spora antara 16 dan 24 jam periode inkubasi. Hasil ini mengindikasikan bahwa produksi tertinggi protease dicapai selama fase eksponensial dan berlangsung konstan saat fase stasioner. Produksi protease pada fase eksponensial telah dilaporkan oleh Mubarik dan Wirahadikusumah (1996).



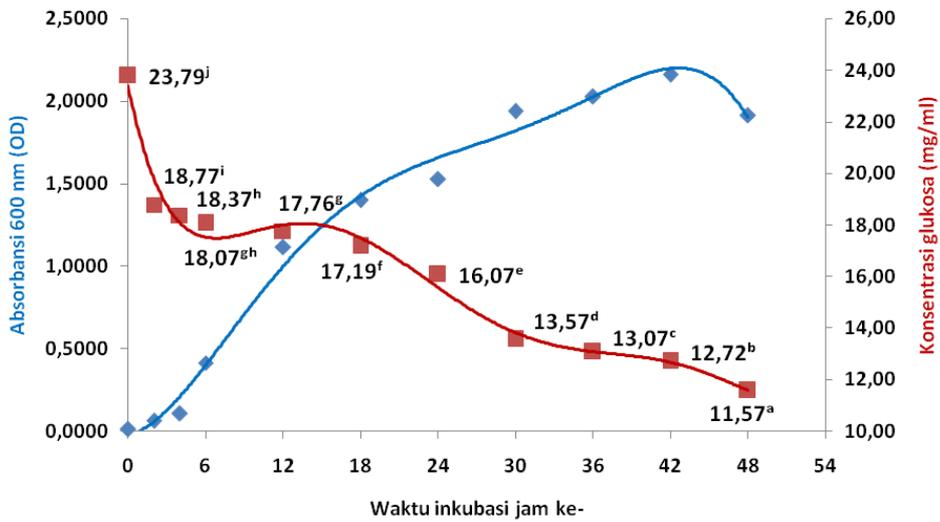
Gambar 1. Pertumbuhan Isolat 36K pada Parameter: (A) OD dan (B) Biomassa Kering.



Gambar 2. Pertumbuhan dan Kadar Protein Bakteri Isolat 36K.



Gambar 3. Pertumbuhan dan Aktivitas Protease Bakteri Isolat 36K.



Gambar 4. Pertumbuhan dan Kadar Glukosa Kultur Bakteri Isolat 36K.

Konsumsi substrat pada bakteri isolat 36K dapat dilihat dari penurunan gula reduksi (Gambar 4) dengan laju konsumsi substrat sebesar 2,0557 g.g⁻¹. Semakin tinggi OD sel yang merupakan laju pertumbuhan dari bakteri isolat 36K maka semakin rendah gula reduksi yang tersisa, begitu pula sebaliknya. Secara umum substrat dimanfaatkan oleh mikroorganisme untuk pembelahan sel, pertumbuhan biomassa, pemeliharaan sel dan menghasilkan produk metabolit. Hal yang sama juga ditunjukkan oleh pertumbuhan *Bacillus* pada media kultivasi (Yuliana, 1997), pertumbuhan *Aspergillus* pada media cair industri tapioka (Hartati, 1999), dan pertumbuhan mikroorganisme pada media hidrolisat ubi kayu (Hasanudin *et al.*, 1994).

Pada penelitian ini laju konsumsi substrat bakteri isolat 36K menunjukkan penurunan yang relatif tajam yang berarti glukosa di dalam media dapat digunakan secara maksimal dalam pertumbuhan bakteri. Tinggi rendahnya kandungan glukosa sisa dalam media dipengaruhi oleh kemampuan mikroorganisme untuk mengkonversi sumber karbon yang terdapat dalam substrat menjadi biomassa dan produk metabolit. Namun glukosa yang berfungsi sebagai substrat dapat juga menjadi salah satu faktor penghambat pertumbuhan jika konsentrasinya berlebih atau kurang dari nilai kritisnya (Pirt, 1975; Young, 1987).

Kesimpulan

Berdasarkan kinetika pertumbuhan bakteri isolat 36K memiliki fase lag pada waktu kultivasi jam ke-0 sampai jam ke-4, sedang pada jam ke-6 sampai jam ke-30 memasuki fase eksponensial dengan nilai OD $1,939 \pm 0,0125$ dengan berat kering biomassa bakteri sebesar $1,325 \pm 0,043$ mg.ml⁻¹, laju pertumbuhan spesifik (μ) sebesar 0,1446 jam⁻¹, jumlah generasi 8,7609 dan waktu generasi 4,794 jam. Selanjutnya waktu pertumbuhan ke-36 jam hingga jam ke-42, sel isolat 36K mengalami fase stasioner. Berikutnya adalah fase kematian pada jam ke-42 hingga 48 jam. Kadar protein menunjukkan bahwa dari diawal sampai akhir penelitian mengalami penurunan sebesar 97,365 %. Nilai laju penurunan kadar protein di media kultur bakteri adalah $0,255 \pm 0,005$ mg.ml⁻¹.jam⁻¹.

Daftar Pustaka

Annamalai, N., A. Kumar., A. Savanakumar., A. Vijajlakshmi. & T. Balasubramanian., 2011, Characterization of Protease from *Algaligens faecalis* and Its antibacterial Activity on Fish Patogens, *J. Environ. Biol.* 32:781-786.

Avnimelech Y. & G. Ritvo. 2003. Shrimp and fish pond soils: processes and management. *Aquaculture*. 220(1-4):549-567 doi:10.1016/S0044-8486(02)00641-5

Chantawannakul P, A. Onchalee, K. Klanbut, E. Chukeatirote & S. Lumyong. 2002. Characterization of proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 galured from traditionally fermented soybean in Northern Thailand. *Science Asia* 28:241-245.

Fardiaz, S. 1987. Fisiologi Fermentasi. Pusat Antar Universitas IPB. Bogor. 186 hlm.

Gaman, P.M. & K.B. Sherrington. 1994. Pengantar Ilmu Pangan Nutrisi dan Mikrobiologi. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 317 hlm.

Ghaly, A.E., M.S.A. Tango & M.A. Adams. "Enhanced Lactic Acid Production from Cheese Whey with Nutrient Supplement Addition". *Agricultural Engineering International: the CIGR J. Sci. Res. & Dev.* Manuscript FP 02 009. May, 2003.

Hartati, Y. 1999. Kinetika pertumbuhan *Aspergillus oryzae* dan *Aspergillus* sp. B.04 dalam kultur terendam pada media limbah cair industri tapioka yang diperkaya dengan dedak. Skripsi Unila. Bandar Lampung.

Hasanudin, U. Medikasari, & T. P. Utomo. 1994. Kinetika pertumbuhan mikroorganisme dan produksi alkohol pada media hidrolisat ubi kayu. Laporan Penelitian. Universitas Lampung. Bandar Lampung.

Holmer, M., N. Marba, E. Diaz-Almela, C.M. Duarte, M. Tsapakis & R. Danovaro. 2007, Sedimentation of Organic Matter From Fish Farms In Oligotrophic Mediterranean Assessed Through Bulk & Stabel Isotope (D13c and D15n) Analyses. *Aquaculture*. 262:268-280. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.09.033

Jackson C, N. Preston, P.J. Thompson & M. Burford. 2003. Nitrogen Budget and Effluent Nitrogen Components at an Intensive Shrimp Farm. *Aquaculture*. 218 : 397-411. doi: 10.1016/S0044-8486(03)00014-0

Judoamidjojo, M., A.A. Darwis & E.G. Sa'id. 1990. Teknologi Fermentasi. Rajawali Pers. Jakarta. 333 hlm.

Karigar, C. S. & S. S. Rao., 2011, Role of Microbial Enzymes in the Bioremediation of Pollutants:

- A Review. *Enzyme Res.* Article ID 805187, 11 p. <http://dx.doi.org/10.4061/2011/805187>
- Kosim, M. & S. R. Putra. 2010. Pengaruh Suhu Pada Protease dari *Bacillus subtilis*. Prosiding Skripsi Semester Genap 2009-2010. Jurusan Kimia FMIPA ITS Surabaya.
- Kumar, A., B. S. Bisht, V. D. Joshi & T. Dhewa, 2011, Review on Bioremediation of Polluted Environment: A Management Tool. *Int. J. Environ. Sci.*, 6:1079–1093.
- Mangunwidjaja, D. & A. Suryani. 1994. Teknologi Bioproses. Penerbit Swadaya. Jakarta.. 394 hlm.
- Middlebeek, E.J., R.O. Jenkins & J.S. Drijver-de Haas. 1992. Growth in batch culture. In *Vitro Cultivation of Micro-organisms*. Biotechnology by Open Learning.
- Mubarik N. R. & M. Wirahadikusumah. 1996. Pemurnian dan karakterisasi protease ekstraseluler *Bacillus subtilis* ATCC 6633. *Hayati* 3:50-54.
- Oke, M.A. & A. A Onilude, 2014, Partial Purification and Characterization of Extracellular Protease from *Pediococcus acidilactici*. *Nigerian J. Basic App. Sci.*, 22(1&2):19-25.
- Pirt, S.J. 1975. Principles of Microbe and Cell Cultivation. Blackwell Scientific Publication. London.
- Qian P.Y., M.C.S. Wu, I. H. Ni, 2001, Comparison of Nutrients Release Among Some Maricultured Animals. *Aquaculture*. 200:305–316. doi: 10.1016/S0044-8486(00)00604-9
- Satiawihardja, B., M. T. Suhartono & A. Kusdinar, 1997. Mempelajari Pengaruh Lingkungan Kimiawi Terhadap Aktifitas dan Daya Tahan Panas protease dari *Bacillus pumilus* Y1. *Bul. Teknol. Industri Pangan*. 8(2):1-11
- Scragg, A.H. 1991. Bioreactors in Biotechnology, A Practical Approach. Ellis Horwood, New York.
- Setyati, W.A & Subagiyo, 2012, Isolasi dan Seleksi Bakteri Penghasil Enzim Ekstraseluler (proteolitik, amilolitik, lipolitik dan selulolitik) yang Berasal dari Sedimen Kawasan Mangrove. *Ilmu Kelautan*. 17(3):164-169.
- Setyati, W. A., M. Erni, A. Triyanto, Subagiyo & M. Zainuddin, Selection Identification and Optimization of the Growth Water Probiotic Consortium of Mangrove Ecosystems as Bioremediation and Biocontrol in Shrimp Ponds, *J. Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia* 17(3):242-252.
- Sharma, S. 2012. Bioremediation: Features, Strategies and Applications, *Asia J. Pharm. and Life Sci.* 2(2):202 - 213.
- Sugiyono, A. J. Lintang, R. A. Sabe. 2003. Penapisan dan Karakterisasi Protease Bakteri Termofilik Asal Mata Air Laut Panas Poso Sulawesi Tengah.
- Ward O. P., M. B. Rao & A. Kulkarni. 2009. Proteases production. *Appli. Microbiol. Industrial*. pp 495-511.
- Wenge, F. & A.F. Methews. 1999. Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum* kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. *Biochem. Eng. J.* 3: 163–170. doi:10.1016/S1369-703X(99)00014-5
- Young, M.M. 1987. The Principles, Application and Regulation of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine. *Comprehensive Biotechnol.* 220(2):387–389. doi:10.1016/0014-5793(87)80852-9
- Yuliana, N. 1997. Kinetika produksi biosurfaktan oleh *Bacillus subtilis* ATCC 23132 pada system kultivasi dua fasa. Tesis. IPB. Bogor.
- Yuliana, N., 2008, Kinetika Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat Isolat T5 yang Berasal dari Tempoyak. *J. Teknologi Industri dan Hasil Pertanian*. 13(2):108-116