

ISOLASI DAN PENAPISAN AKTINOMISETES YANG BERPOTENSI MENGHASILKAN ENZIM PROTEASE DARI TAMBAK IKAN BANDENG (*Chanos chanos*) DI KECAMATAN TUGU, SEMARANG

*Isolation and Screening of Actinomycetes which Potentially Producing Protease Enzyme from Milkfish (*Chanos chanos*) Pond Sediments in Tugu District, Semarang*

Farha Tsabita Amanina, Max Rudolf Muskananfola dan Diah Ayuningrum
Departemen Sumberdaya Akuatik, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro
Jl. Prof. H. Soedarto, S.H, Tembalang, Semarang 50275, Jawa Tengah, Indonesia. Tel.: +62-24-7474698
Email: farhatsania26@gmail.com

Diserahkan tanggal 27 Desember 2021, Diterima tanggal 3 April 2022

ABSTRAK

Limbah pada sedimen tambak bandeng berupa bahan organik, bersumber dari sisa pakan dan hasil metabolisme. Limbah ini mengandung protein yang tinggi, apabila tidak diproses dengan baik dapat mencemari lingkungan perairan. Aktinomisetes merupakan organisme tanah yang memiliki peran penting dalam proses dekomposisi bahan organik dengan bantuan enzim. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi aktinomisetes yang mampu menghasilkan enzim protease. Jenis penelitian yang dilakukan yaitu deskriptif eksploratif. Sampel sedimen diambil dari dasar tambak ikan bandeng Kecamatan Tugu, Semarang pada 2 titik *outlet* tambak dengan metode *coring* modifikasi. Proses isolasi dilakukan menggunakan media IM5, IM6, IM7 dan IM8 dengan metode *pour plate*, sedangkan purifikasi dengan media IM6 dan IM8 menggunakan metode *streak plate*. Isolat diskriminasi dengan media spesifik *Skim Milk Agar* untuk melihat zona hambat di sekitar koloni sehingga diketahui Indeks Proteolitik (IP). Sebanyak 11 dari 17 isolat aktinomisetes mampu memproduksi enzim protease, tiga isolat berasal dari media IM6 dan 8 isolat dari media IM8. Diperoleh tiga isolat dengan kemampuan paling baik dalam menghasilkan enzim protease dengan nilai IP diatas 1,5, yaitu isolat VTB 1.1, VTB 1.2 dan YTB 1.2. Penelitian lanjutan perlu dilakukan untuk membuktikan bahwa ketiga isolat tersebut mampu menjadi agen pendekomposisi kandungan protein berlebih pada sedimen tambak.

Kata kunci: Aktinomisetes; Bahan Organik; Indeks Proteolitik; Sedimen; Tambak

ABSTRACT

Waste in milkfish pond sediment comes from feed residues and metabolic products. This waste contains high protein, if not processed properly it can pollute the aquatic environment. Actinomycetes are soil organisms that have an essential role in decomposing organic matter with the help of enzymes. This study aims to isolate actinomycetes capable of producing protease enzymes. The type of research conducted is descriptive exploratory. Sediment samples were taken from the bottom of the milkfish pond, Tugu District, Semarang at two outlet points with a modified coring method. The isolation process was carried out using IM5, IM6, IM7, IM8 media with the pour plate method, while the purification with IM6 and IM8 media used the streak plate method. The isolates were screened with a specific medium, Skim Milk Agar to see the zone of inhibition around the colony so that the Proteolytic Index (IP) was known. As many as 11 of the 17 actinomycetes isolates were able to produce protease enzymes, three isolates came from IM6 media and 8 isolates from IM8 media. Three isolates were obtained with the best ability to produce protease enzymes with IP values above 1.5, namely isolates VTB 1.1, VTB 1.2 and YTB 1.2. Further research needs to be done to prove that the three isolates are capable of being a decomposition agent for excess protein content in pond sediments.

Keywords: Actinomycetes; Organic Matter; Pond; Proteolytic Index; Sediment

PENDAHULUAN

Ikan Bandeng (*Chanos chanos*) merupakan salah satu jenis produk unggulan budidaya tambak selain udang, rumput laut, kerapu dan kakap (Ichdayati *et al.*, 2013). Bandeng menjadi fokus pemerintah karena komoditas ini merupakan salah satu komoditas yang dominan dibudidayakan di tambak. Pengembangan komoditas ini diharapkan mampu membangkitkan kembali lahan tambak yang mangkrak (kurang berfungsi) dan kurang intensif (Hikmayani dan Putri, 2014).

Menurut KKP (2018), pengembangan budidaya air payau memiliki porsi potensi penggunaan lahan hingga mencapai 2,8 juta ha, tetapi pemanfaatannya diperkirakan baru sekitar 21,64 % atau seluas 605.000 ha.

Kurangnya pengoptimalan lahan tambak di pesisir Indonesia mendorong pemerintah, melalui Kementerian Kelautan dan Perikanan (KKP) untuk mengeluarkan kebijakan terkait pembangunan perikanan budidaya yaitu pembangunan/revitalisasi tambak udang dan bandeng yang merupakan *Major Project* Rencana Pembangunan Jangka Menengah Nasional

(RPJMN) 2020-2024. Sejalan dengan strategi tersebut, perlu dilakukan manajemen pengelolaan limbah tambak yang baik sehingga kualitas lingkungan perairan tetap terjaga.

Menurut Aprilia *et al.* (2018), pada aktivitas pertambakan mengalami penurunan kualitas air tambak akibat dari masukan bahan organik terutama sisa pakan yang terbuang secara langsung maupun tidak langsung. Sisa pakan dan feses yang terakumulasi di sedimen akan berubah menjadi polutan. Limbah tambak seperti sisa pakan yang terurai merupakan beban polutan di perairan umum. Dari pandangan ekonom menurut Wossink dan Denaux (2002) bahwa proses produksi yang tidak efisien merupakan penyebab mendasar terjadinya polusi. Bahan-bahan organik yang dapat terakumulasi di sedimen tambak antara lain adalah karbohidrat dan protein. Tingginya kadar protein pada sedimen tambak apabila terurai di dalam air akan berubah menjadi senyawa ammonium (NH_4^+) dan amonia (NH_3). Menurut Boyd (1979), amonia merupakan senyawa yang berbahaya dan tidak diperbolehkan ada dalam suatu perairan karena akan menurunkan kadar oksigen terlarut (DO) dan menyebabkan penyempitan pembuluh darah pada insang. Lebih lanjut berdasarkan Rudiyantri *et al.* (2009) dilaporkan bahwa nilai total beban pencemaran dari posfat total pada tambak bandeng di Pasar Banggi, Rembang saat pengukuran pasang: 2541,15 ton/th dan pada pengukuran surut: 201,9 ton/th, parameter amoniak pada pengukuran pasang: 116329,53 ton/th dan pengukuran surut: 14367,75 ton/th sedangkan pada parameter nitrit untuk pengukuran pasang: 12050,1 ton/th dan pengukuran surut: 2612,28 ton/th. Dari hasil yang diperoleh dapat ditarik kesimpulan bahwa nilai beban pencemaran paling besar disumbangkan oleh parameter amoniak.

Protease merupakan enzim yang mampu menghidrolisis ikatan peptida pada protein menjadi oligopeptida dan asam amino. Penting dan memiliki nilai ekonomi yang tinggi karena aplikasinya sangat luas (Syafie *et al.*, 2013). Berbagai enzim, khususnya protease mikroba, paling banyak digunakan di berbagai sektor perusahaan, seperti tekstil, deterjen, kulit, pakan, limbah. Karena mereka melakukan fungsi sintetik dan degradatif, protease ditemukan dimana-mana, seperti pada tumbuhan, hewan, dan mikroba. Protease juga dianggap sebagai alternatif bahan kimia dan bioindikator yang ramah bagi alam dan lingkungan (Razzaq *et al.*, 2019).

Aktinomisetes merupakan salah satu mikroorganisme yang hidup di tanah (*soil organism*) dan merupakan organisme heterotrof yang memanfaatkan bahan organik pada sedimen untuk sumber makanannya. Menurut Tuna dan Uzel (2007), aktinomisetes alkalifilik MA1-1 diisolasi dari sampel sedimen Teluk Izmir, Turki dan hasilnya diketahui bahwa isolat ini sebagai penghasil protease alkali ekstraseluler paling baik dari isolat aktinomisetes lain yang dimiliki. Putri *et al.* (2018) melakukan penelitian tentang identifikasi aktinomisetes sedimen air tawar dan aktivitasnya sebagai anti-bakteri dan pelarut fosfat. Hasilnya ditemukan bahwa genera *Streptomyces*, *Actinomadura*, dan *Kitasatospora* mampu mengeksresikan asam organik dalam proses pengasaman yang akan melepaskan fosfat terikat menjadi fosfat bebas.

Sejauh ini belum ditemukan publikasi yang meneliti tentang fungsi aktinomisetes sebagai agen penghasil enzim protease dari sedimen perairan tambak ikan bandeng di Kecamatan Tugu, Semarang. Penelitian ini perlu dilakukan dengan tujuan untuk mengisolasi aktinomisetes dari sedimen tambak ikan bandeng dan melakukan skrining isolat mana saja yang berpotensi menghasilkan enzim protease.

METODE PENELITIAN

Pemilihan lokasi penelitian dilakukan secara sengaja (*purposive*) di Mangunharjo, Kecamatan Tugu, Semarang. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah jenis deskriptif eksploratif dengan pendekatan secara kualitatif dan kuantitatif. Pendekatan secara kualitatif dilakukan untuk mengetahui jenis aktinomisetes yang terdapat di lokasi ini dan mampu menghasilkan enzim protease. Pendekatan secara kuantitatif dilakukan dengan cara menghitung nilai Indeks Proteolitik (IP) dari masing-masing isolat aktinomisetes.

Waktu dan Tempat

Sampel sedimen diambil dari outlet pada 2 petak tambak ikan bandeng di Mangunharjo, Kecamatan Tugu, Semarang seperti yang disajikan pada Gambar 1. Uji laboratorium dilaksanakan di *Tropical Marine Biotechnology*, Gedung J, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro, Semarang. Penelitian dilakukan selama 7 bulan yaitu pada Agustus 2020 hingga Februari 2021.



Gambar 1. Peta Lokasi Sampling di Tambak Ikan Bandeng (*C. chanos*) Mangunharjo, Kecamatan Tugu, Semarang

Sampling

Pengambilan sampel dilakukan dari tepi tambak menggunakan pipa paralon yang dimodifikasi menjadi *sediment core* dengan satu ujung pipa tertutup dan ujung lainnya dibiarkan terbuka. Metode ini disebut metode *coring*, pipa paralon AW 3 inchi ditancapkan ke sedimen, kemudian sampel sedimen yang berada 5-10 cm bagian bawah pipa dimasukkan kedalam plastik *ziplock* steril dan disimpan dalam *cool box* yang telah diisi *ice gel* beku agar komposisi mikroba dalam sedimen tidak banyak berubah untuk kemudian diproses di laboratorium (Ayuningrum *et al.*, 2021).

Sterilisasi Alat dan Bahan

Seluruh alat dan bahan, kecuali sampel sedimen, yang digunakan dalam proses penelitian harus disterilisasi terlebih dahulu menggunakan autoklaf untuk menjaga kondisi agar tetap steril tanpa kontaminasi. Sampel sedimen tidak disterilisasi agar mikroba yang akan diamati tetap hidup. Proses sterilisasi termal menggunakan uap jenuh di bawah tekanan berlangsung di suatu bejana yang disebut autoklaf, dan merupakan proses sterilisasi yang paling banyak dilakukan. Suatu siklus autoklaf untuk media atau pereaksi adalah selama 15 menit pada suhu 121 °C kecuali dinyatakan lain (Kurniawansyah, 2016). Uap panas basah mematikan mikroba melalui proses koagulasi, denaturasi enzim dan protein protoplasma mikroba, sedangkan untuk mematikan spora diperlukan panas basah selama 15 menit pada suhu 121 °C (Hadioetomo, 1985).

Proses sterilisasi pada media isolasi dan purifikasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 20 menit. Komposisi dari media yang digunakan dalam proses isolasi adalah sebagai berikut (Bredholt *et al.*, 2008): IM5 (agar asam humat, dengan air laut), terdiri atas asam humat (1 g), K₂HPO₄ (0,5 g), FeSO₄ • 7H₂O (1 mg), agar (20 g), vitamin B (1 mL), air laut alami (0,5 L) dan aquades (0,5 L); IM6, terdiri atas gliserol (0,5 g), pati (0,5 g), sodium propionat (0,5 g), KNO₃ (0,1 g), asparagin (0,1 g), kasein (0,3 g), K₂HPO₄ (0,5 g), FeSO₄ • 7H₂O (1 mg), agar (20 g), vitamin B (1 mL), air laut alami (0,5 L) dan aquades (0,5 L); IM7 (*chitin agar*, dengan air laut) kitin, K₂HPO₄ (0,5 g), FeSO₄ • 7H₂O (1 mg), agar (20 g), vitamin B (1 mL), air laut alami (0,5 L) dan aquades (0,5 L); IM8, terdiri atas ekstrak malt (1 g), gliserol (1 g), glukosa (1 g), pepton (1 g), agar (20 g), air laut alami (0,5 L) dan aquades (0,5 L). Keempat jenis media isolasi tersebut digunakan untuk memperbesar peluang terisolasinya berbagai jenis aktinomisetes. Semakin banyak jumlah dan jenis isolat yang terisolasi diharapkan mampu diperoleh isolat yang paling baik dan berpotensi dalam menghasilkan enzim protease. Konsentrasi pH seluruh media isolasi diatur dengan penambahan NaOH hingga pH 8,2. Pengukuran pH dilakukan dengan kertas pH meter.

Setelah proses sterilisasi perlu ditambahkan vitamin B kompleks, *Nystatin* sebagai anti jamur dan juga *Nalidixic acid* sebagai anti bakteri Gram negatif karena media yang digunakan dibuat spesifik untuk aktinomisetes yang merupakan bakteri Gram positif. Ketiga bahan tadi ditambahkan ke media isolasi sebanyak 0,1% dari ml volume yang dibuat.

Sterilisasi media *Skim Milk Agar* (SMA) berbeda dengan sterilisasi media lainnya, karena sifat protein yang mudah rusak apabila dipanaskan pada suhu tinggi. Sterilisasi SMA dilakukan 2 tahap, yang pertama adalah susu skim bubuk yang dilarutkan dalam 50% dari total volume aquades

disterilisasi pada suhu 105 °C selama 5 menit. Komposisi selain susu skim bubuk disterilisasi seperti biasa yaitu pada suhu 120 °C selama 20 menit. Menurut Tennalli *et al.* (2012), kultur bakteri diseleksi untuk mengetahui kemampuan produksi protease pada *skim milk agar* (kasein 0,5%, *yeast extract* 0,25%, dekstrose 0,1%, susu skim bubuk 2,8% dan agar 1,5%). Pelarut yang digunakan adalah 50% air laut dan 50% aquades.

Pengenceran Bertingkat

Sebelum isolasi, dilakukan proses pengenceran dengan metode pengenceran bertingkat (*serial dilution*). Menurut Wasteson dan Hornes (2009), tujuan dari pengenceran bertingkat yaitu memperkecil atau mengurangi jumlah mikroba yang tersuspensi dalam cairan. Perbandingan sampel dengan pelarut yang digunakan yaitu 1 : 9. Sedimen tambak bandeng ditimbang sebanyak 1 gram kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml air laut steril dan dihomogenkan. Selanjutnya, diambil 1 ml cairan dari tabung sebelumnya dan dimasukkan kedalam tabung berisi 9 ml air laut steril, proses ini disebut pengenceran 10⁻¹. Begitu seterusnya hingga diperoleh pengenceran 10⁻⁵.

Isolasi dan Purifikasi

Metode *pour plate* digunakan dalam proses isolasi aktinomisetes (Sivanandhini *et al.*, 2015). Sebanyak 35 µl sampel dari seri pengenceran 10⁻⁴ dan 10⁻⁵ ditetaskan kedalam 4 cawan petri kosong dengan mikropipet. Kemudian media IM 5, IM 6, IM 7 dan IM 8 dituang ke masing-masing cawan petri dan diratakan. Setelah itu, petri diinkubasi selama 7 hari dalam suhu ruangan 28 ± 2 °C agar aktinomisetes dapat tumbuh dengan baik. Menurut Sengupta *et al.* (2015), strain aktinomisetes diinokulasi dan diinkubasi pada suhu 28 ± 2 °C selama 7 hari. Sedangkan proses purifikasi dilakukan dengan metode *streak plate* dengan menggoreskan isolat pada media baru IM6 dan IM8 menggunakan tusuk gigi.

Karakterisasi Morfologi Isolat

Morfologi koloni aktinomisetes diamati secara makroskopis setelah 14 hari inkubasi pada suhu ruang. Aspek-aspek yang diamati yaitu bentuk margin, elevasi, tekstur permukaan, bentuk koloni, aerial hifa dan substrat hifa mengacu pada *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*.

Skrining Aktivitas Enzim Protease

Isolat yang diperoleh dari proses isolasi dan purifikasi kemudian di-dotting (di-inokulasikan 1 ose koloni bakteri berbentuk bulat dengan diameter 2-3 mm) pada media *Skim Milk Agar* (SMA) dengan tusuk gigi steril. Menurut Tennalli *et al.* (2012), kultur bakteri diseleksi untuk mengetahui kemampuan produksi protease pada *skim milk agar* (kasein 0,5%, *yeast extract* 0,25%, dekstrose 0,1%, susu skim bubuk 1% dan agar 1,5%). Pelarut yang digunakan adalah 50% air laut dan 50% aquades. Sterilisasi media SMA dilakukan 2 tahap, yang pertama yakni susu skim bubuk yang dilarutkan dalam 50% dari total volume aquades disterilisasi pada suhu 105 °C selama 5 menit. Sedangkan komposisi selain susu skim bubuk disterilisasi seperti biasa yaitu pada suhu 120 °C selama 20 menit.

Isolat diinkubasi pada suhu ruangan dan setelah itu dilakukan pengukuran diameter koloni dan diameter zona hambat pada hari ke 7, 10 dan 14 menggunakan jangka

sorong.. Menurut Anggorowati *et al.* (2019), reaksi positif bakteri yang memiliki enzim ekstraseluler protease akan ditunjukkan apabila bakteri yang ditanam pada media selektif Skim Milk Agar (SMA) menghasilkan zona bening (*clear zone*) di sekeliling koloni. Indeks proteolitik didapatkan dengan membandingkan diameter koloni aktinomisetes dengan diameter zona hambat menggunakan rumus (Suryadi *et al.*, 2013):

$$\text{Indeks Proteolitik (IP)} = \frac{\text{d. Zona Bening}}{\text{d. Koloni}}$$

Kemudian nilai IP dianalisis dengan memilih isolat yang memiliki nilai IP diatas 1,5. Isolat tersebut dianggap sebagai isolat yang memiliki kemampuan paling baik dalam memproduksi enzim protease daripada isolat lainnya. Pengukuran diameter koloni dan zona hambat menggunakan Vernier Caliper dengan hasil satuan milimeter (mm).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Gambaran Umum Lokasi

Sampel sedimen yang digunakan dalam penelitian diambil dari tambak ikan bandeng di Mangunharjo, Kecamatan Tugu, Semarang. Pengambilan sampel dilakukan di 2 titik sampling di 2 petak tambak yang berbeda. Stasiun terletak pada garis lintang 6°57'20"S dan garis bujur 110°18'45"U. Titik sampling terletak pada saluran pembuangan petak tambak. Luas petak tambak cukup kecil dibandingkan dengan tambak lain, namun pada petak tambak kedua lebih sejuk karena terdapat pohon mangrove disekitarnya. Tambak berada dekat dengan pemukiman penduduk, hanya berjarak kurang lebih 20 meter. Pengambilan sampel sedimen dilakukan pada hari Rabu, 24 Juni 2020 pukul 12.30 sehingga cuaca cukup terik. Pada bulan ini, kondisi tambak ikan bandeng kosong karena ikan sudah dipanen atau sudah memasuki masa pasca panen. Karakteristik sedimen yang diambil dari kedua petak tambak ini adalah berlumpur, berwarna hitam dan berbau. Karakteristik ini dapat dikaitkan dengan pakan yang digunakan selama proses produksi.

Sedimen yang diperoleh dari titik sampling tambak ikan bandeng di Mangunharjo, Kecamatan Tugu, Semarang memiliki karakteristik visual berwarna coklat keabu-abuan dengan tekstur lembut seperti liat atau lempung. Menurut Tefarani *et al.* (2019), ekosistem mangrove Mangunharjo yang berlokasi di kecamatan Tugu, merupakan yang paling luas di daerah Semarang dan menjadi wilayah mangrove percontohan di Indonesia. Luas mangrove di daerah tersebut bertambah secara pesat dari tahun 2012-2017, dari luasnya 19,78 Ha menjadi 68,47 Ha. Menurut Chrisyariati *et al.* (2014), fraksi tanah yang diambil dari sedimen di ekosistem mangrove Mangunharjo didominasi oleh jenis pasir dan lumpur. Sedangkan menurut penelitian Budi (2016), tekstur tanah dasar tambak bandeng di Mangunharjo, Tugu, Semarang adalah lempung berpasir berdebu dengan kisaran liat 21,17%, pasir 29,14% dan debu 46,33%.

Isolasi dan Purifikasi Aktinomisetes

Isolat aktinomisetes yang diperoleh dari proses isolasi dan purifikasi sampel sedimen tambak ikan bandeng di Kecamatan Tugu, Semarang yaitu sejumlah 17 isolat. Sebanyak 12 isolat diperoleh dari titik sampling yang terletak

di saluran pembuangan petak 1 dan 5 isolat diperoleh dari titik sampling di saluran pembuangan petak 2. Serasah mangrove ditemukan pada dua petak tambak tempat sampling dilakukan.

Proses isolasi aktinomisetes dari sedimen tambak ikan bandeng Kecamatan Tugu, Semarang dilakukan menggunakan media IM 5, IM 6, IM 7 dan IM 8. Penamaan kode isolat di depan kode titik sampling adalah berdasarkan jenis media yang digunakan saat isolasi; kode X untuk isolat dengan media IM 5, kode Y untuk isolat dengan media IM 6, kode V untuk isolat dengan media IM 7, dan kode Z untuk isolat dengan media IM8. Sedangkan untuk proses purifikasi hanya menggunakan media IM 6 dan IM 8, karena setelah dilakukan beberapa kali pengulangan, isolat aktinomisetes yang dimiliki tumbuh optimal pada kedua jenis media tersebut. Menurut Bredholt *et al.* (2008), jumlah tertinggi koloni mirip *Streptomyces* ditemukan ketika sedimen Biologen 6m ditumbuhkan di agar IM 6 (dimodifikasi Kuster).

Penggunaan empat jenis media berbeda pada tahap isolasi bertujuan untuk memperbesar peluang didapatkannya jenis isolat yang beragam, karena kandungan sumber karbon dan sumber nitrogen pada media berpengaruh terhadap pertumbuhan isolat aktinomisetes. Pati sebagai sumber karbon dan kasein sebagai sumber nitrogen pada media IM6, sedangkan pada media IM8 ekstrak malt sebagai sumber karbon dan pepton sebagai sumber nitrogen mampu menyuplai pertumbuhan aktinomisetes secara baik. Menurut Todar (2007), media pertumbuhan yang baik merupakan media yang mampu menyediakan sumber dan mineral-mineral lain yang dibutuhkan dalam pertumbuhan maupun aktivitasnya. Menurut Poernomo *et al.* (2017), beberapa sumber karbon yang dibutuhkan untuk produksi protease diketahui amilum adalah substrat terbaik, diikuti oleh natrium sitrat, asam sitrat dan sukrosa. Di antara berbagai sumber nitrogen organik dan anorganik NH_4NO_3 telah diketahui yang terbaik.

Karakteristik morfologi seluruh isolat aktinomisetes diamati secara makroskopis dengan melihat bentuk aktinomisetes secara kasat mata dari cawan petri. Pengamatan secara makroskopis dilakukan setelah aktinomisetes tumbuh sempurna selama sekitar 2 minggu atau 14 hari. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Alwi *et al.* (2020), bahwa kultur aktinomisetes diinkubasi pada suhu 28 °C selama 10 hari dan diamati warna, bentuk, elevasi, pinggiran, tekstur permukaan, dan warna di balik koloni; serta warna *aerial hypha* (miselium udara), *vegetative hypha* (miselium substrat) serta pigmen terdifusi. Koloni aktinomisetes membentuk konsistensi mirip tepung dan menempel kuat pada permukaan agar-agar, menghasilkan hifa dan konidia sporangia, seperti jamur di media kultur (Dhanasekaran dan Jiang, 2016). Variasi bentuk bakteri yang terjadi dipengaruhi oleh faktor lingkungan, faktor makanan (medium tumbuh) dan suhu (minimum, optimum, dan maksimum) (Ilyas, 2001).

Seluruh isolat yang diperoleh yaitu sebanyak 17 isolat aktinomisetes diuji kemampuannya untuk menghasilkan enzim protease. Hasil uji tersebut ditunjukkan dengan munculnya zona bening jika isolat mampu menghasilkan enzim protease (Gambar 2). Selanjutnya diameter zona bening dibandingkan dengan diameter koloni untuk menentukan nilai Indeks Proteolitik (IP). Hasil perhitungan Indeks Proteolitik (IP) untuk masing-masing isolat aktinomisetes disajikan pada Tabel 2.

Tabel 1. Hasil Karakterisasi Morfologi Isolat secara Makroskopis Isolat Aktinomisetes dari Sedimen Tambak Bandeng Mangunharjo, Kecamatan Tugu, Semarang

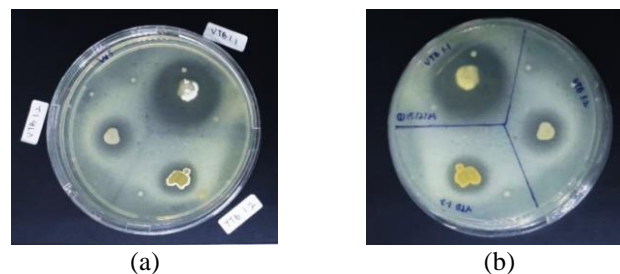
Kode Isolat	Margin	Elevasi	Bentuk	Warna
XTB 1.1	<i>Irregular</i>	<i>Flat</i>	<i>Round</i>	Abu-abu
XTB 1.2	<i>Irregular</i>	<i>Flat</i>	<i>Fillamentous</i>	Abu-abu
XTB 1.3	<i>Irregular</i>	<i>Flat</i>	<i>Irregular</i>	Abu-abu
YTB 1.1	<i>Irregular</i>	<i>Convex</i>	<i>Rough with scalloped margin</i>	Coklat
YTB 1.2	<i>Irregular</i>	<i>Hilly</i>	<i>Irregular</i>	Abu-abu
YTB 1.3	<i>Wavy</i>	<i>Ingrowing into medium</i>	<i>Irregular</i>	Putih
YTB 1.4	<i>Irregular</i>	<i>Ingrowing into medium</i>	<i>Round</i>	Kuning
VTB 1.1	<i>Irregular</i>	<i>Convex</i>	<i>Round</i>	Putih
VTB 1.2	<i>Irregular</i>	<i>Crateriform</i>	<i>Round</i>	Putih
ZTB 1.1	<i>Wavy</i>	<i>Convex</i>	<i>Round</i>	Putih
ZTB 1.2	<i>Wavy</i>	<i>Crateriform</i>	<i>Round</i>	Kuning
ZTB 1.3	<i>Irregular</i>	<i>Hilly</i>	<i>Round</i>	Abu-abu
XTB 2.1	<i>Irregular</i>	<i>Hilly</i>	<i>Irregular</i>	Putih
XTB 2.2	<i>Irregular</i>	<i>Hilly</i>	<i>Irregular</i>	Coklat
XTB 2.4	<i>Irregular</i>	<i>Hilly</i>	<i>Irregular</i>	Kuning
VTB 2.1	<i>Irregular</i>	<i>Flat</i>	<i>Irregular</i>	Abu-abu
VTB 2.2	<i>Irregular</i>	<i>Convex</i>	<i>Irregular</i>	Abu-abu

Tabel 2. Hasil Perhitungan Indeks Proteolitik (IP) dari seluruh Isolat (17 isolat) Aktinomisetes

Kode Isolat	Media	Indeks Proteolitik	
		Ulangan 1 (mm)	Ulangan 2 (mm)
XTB 1.1	IM6	1,57	1,04
XTB 1.2	IM6	1,5	-
XTB 1.3	IM8	1,3	1,34
YTB 1.1	IM6	1,13	1,06
YTB 1.2	IM6	1,47	2,12
YTB 1.3	IM6	-	-
YTB 1.4	IM6	-	-
VTB 1.1	IM8	1,96	2,83
VTB 1.2	IM8	1,99	2,92
ZTB 1.1	IM8	-	-
ZTB 1.2	IM8	-	-
ZTB 1.3	IM8	1,42	-
XTB 2.1	IM8	1,02	1,35
XTB 2.2	IM8	1,35	1,2
XTB 2.4	IM8	1,36	1,49
VTB 2.1	IM8	1,29	1,03
VTB 2.2	IM8	1,62	1,15

Penggunaan nilai Indeks Proteolitik (IP) adalah karena dengan menggunakan metode analisis ini hasil yang diperoleh akan lebih netral. Apabila hanya dilihat dari diameter zona hambatnya saja, akan mengurangi objektifitas dalam pengamatan karena tidak ada pembanding. Hasil pengamatan pada tabel 2 menunjukkan bahwa sebelas isolat diketahui mampu menghasilkan enzim protease dengan kisaran nilai IP antara 1,04 hingga 2,92. Tiga isolat dengan nilai IP paling baik

dari ulangan 1 maupun ulangan 2 yaitu isolat VTB 1.1, VTB 1.2 dan YTB 1.2. VTB 1.1 menghasilkan nilai IP 1,96 pada ulangan 1 dan 2,83 pada ulangan 2. Isolat VTB 1.2 mendapatkan nilai IP 1,99 pada ulangan pertama dan 2,92 pada ulangan kedua. Sedangkan untuk isolat YTB 1.2 memperoleh nilai IP pada ulangan 1 sebesar 1,47 dan pada ulangan 2 yaitu 2,12. Sehingga dari perolehan nilai IP tersebut, dapat disimpulkan bahwa ketiga isolat memiliki kemampuan yang lebih baik dalam mensekresi enzim protease daripada 11 isolat lainnya.



Gambar 2. Skrining enzim protease pada isolat VTB 1.1, VTB 1.2 dan YTB 1.2; a. Tampak atas, b. Tampak bawah

Gambar 2 diatas menunjukkan hasil dari proses skrining enzim protease yang telah diinkubasi selama 14 hari. Pengamatan zona hambat pada proses skrining enzim dilakukan pada hari ke-7, hari ke 10 dan hari ke-14, tetapi hasil yang digunakan hanya pada saat hari ke-14 karena selama kurun waktu tersebut zona hambat masih terus bertambah. Zona hambat dapat dilihat dengan terbentuknya area bening yang mengelilingi koloni isolat aktinomisetes. Menurut Anggorowati *et al.* (2019), reaksi positif bakteri yang memiliki enzim ekstraseluler protease akan ditunjukkan apabila bakteri yang ditanam pada media selektif *Skim Milk Agar* (SMA) menghasilkan zona inhibisi (*clear zone*) di sekeliling koloni.

Ada dua faktor yang mempengaruhi kinerja bakteri dalam menghasilkan enzim protease, salah satunya adalah kandungan media yang digunakan sebagai sumber nutrisi. *Skim Milk Agar* (SMA) mengandung banyak nutrisi seperti kasein, kalsium, kalium, magnesium, fosfor dan lain-lain. Kandungan dalam kasein adalah fosfoprotein yang dapat terikat dengan kalsium untuk membentuk kalsium kalsinat. Zona bening yang terbentuk pada media SMA di sekitar koloni bakteri menunjukkan bahwa protease menghidrolisis molekul kasein pada substrat menjadi peptida (protein sederhana) dan asam amino. Enzim yang disekresikan oleh bakteri secara konstan berada di dalam sel (konstitutif) dan diinduksi dengan pemberian substrat tertentu (*inducible*) dalam produksi konten media (Nurkhasanah dan Widodo, 2015). Menurut penelitian Tuna dan Uzel (2007), produksi protease pada aktinomisetes bervariasi dengan masing-masing sumber karbon. Adanya fruktosa, pati, maltosa dan glukosa D (+) menghasilkan produksi protease yang lebih tinggi. Aktivitas spesifik tertinggi diperoleh dengan menggunakan sumber karbon pati/ *starch*.

Faktor selanjutnya yang dapat mempengaruhi aktivitas enzim dalam menghidrolisis protein adalah suhu. Menurut penelitian Perwendha *et al.* (2020), bakteri mampu tumbuh pada kisaran suhu 30-50 °C, dan mampu menghasilkan zona bening pada cawan berisi susu skim. Zona bening yang dihasilkan merupakan indikasi bahwa strain mensekresi aktivitas enzim proteolitik (protease) ke dalam medium dan mampu mendegradasi susu skim sebagai satu-satunya sumber

karbon. Zona hidrolisis yang dihasilkan pada agar-agar dapat dikaitkan dengan jumlah protease yang dihasilkan oleh mikroba.

KESIMPULAN

Isolasi aktinomisetes dari sedimen dasar tambak bandeng (*Chanos chanos*) di Mangunharjo, Kecamatan Tugu, Semarang diperoleh sebanyak tujuh belas isolat dengan karakteristik morfologi yang berbeda-beda secara makroskopis. Sebanyak sebelas isolat diketahui mampu menghasilkan enzim protease dengan terbentuknya zona hambatan di sekitar koloni. Tiga isolat paling potensial yaitu VTB 1.1, VTB 1.2 dan YTB 1.2 memiliki nilai IP diatas 1,5.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Universitas Diponegoro Semarang yang telah mendanai penelitian ini dengan kontrak No. 233-83/UN7.6.1/PP/2022 dan Laboratorium *Tropical Marine Biotechnology Universitas Diponegoro* atas tersedianya fasilitas alat dan bahan sehingga penelitian ini dapat berjalan dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Anggorowati, D. A., H. Munandar dan L. F. Indriana. (2019). Isolasi dan Penapisan Bakteri Penghasil Enzim Protease, Selulase, dan Amilase dari Sedimen dan Saluran Pencernaan Teripang Hitam *Holothuria Atra*. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*, 11(2), 377-386.
- Alwi, M., Suharjono, T. Ardyati dan Subandi. 2020. Eksplorasi *Actinomycetes* sebagai Kandidat Antibakteri Patogen yang Resisten dari Rhizosfer Tumbuhan Leda (*Eucalyptus deglupta* Blume.) di Taman Nasional Lore Lindu, Indonesia. *Biocelebes.*, 14(3): 253-267.
- Aprilia, D. W., Suprpto, D., & Suryanto, A. (2018). Hubungan Nisbah C/N Dengan Total Bakteri Sedimen Pada Tambak Bandeng (*Chanos chanos* Forsk) Semi Intensif di Desa Wonorejo Kendal. *Management of Aquatic Resources Journal (MAQUARES)*, 6(1), 26-32. <https://doi.org/10.14710/marj.v6i1.19807>
- Ayuningrum, D., A. Sabdaningsih dan O. Jati. (2021). Screening of Actinobacteria-producing Amylolytic Enzyme in Sediment from *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) Ponds in Rembang District, Central Java, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity.*, 22(4), 18199-1828.
- Bako, S., Y. Djayus, dan R. Leidonald. (2016). Dekomposisi Serasah Daun *Avicennia Marina* di Perairan Pulau Sembilan Kecamatan Pangkalan Susu Kabupaten Langkat Provinsi Sumatera Utara. *Aquacoastmarine.*, 14(4), 68-81.
- Boyd, E. C. (1979). *Water Quality in Warm Water Fish Ponds*. Auburn University Agriculture Experiments Station. Auburn. 359 hlm.
- Bredholt, H., E. Fjærvik, G. Johnsen dan S. B. Zotchev. (2008). Actinomycetes from Sediments in The Trondheim Fjord, Norway: Diversity and Biological Activity. *Marine Drugs*, 6(1), 12-24.
- Budi, B. S. (2016). Penanganan Limbah Organik pada Tambak Untuk Memperbaiki Kualitas Tanah Dasar Tambak. *Wahana Teknik Sipil: Jurnal Pengembangan Teknik Sipil*, 20(1), 16-23.
- Chrisyariati, I., B. Hendrarto dan Suryanti. (2014). Kandungan Nitrogen Total dan Fosfat Sedimen Mangrove pada Umur yang Berbeda di Lingkungan Pertambakan Mangunharjo, Semarang. *Management of Aquatic Resources Journal (MAQUARES)*, 3(3), 65-72.
- Dhanasekaran, D dan Jiang, Y. (2016). *Actinobacteria: basics and biotechnological applications*. InTechOpen. London, UK. 398 hal.
- Hadioetomo, R. S. (1985). *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. 161 hlm.
- Hikmayani, Y dan H. M. Putri. (2014). Strategi Pengembangan Pasar Bandeng (*Chanos-chanos* sp). *Jurnal Kebijakan Sosial Ekonomi Kelautan dan Perikanan*, 4(1), 93-104.
- Ichdayati, L. I., Hartoyo, S., Syaikat, Y., & Kuntjoro, S. U. (2013). Pengaruh polutan tambak terhadap efisiensi teknis produksi bandeng di Kabupaten Karawang. *Jurnal Agribisnis Indonesia (Journal of Indonesian Agribusiness)*, 1(2), 107-124.
- Ilyas, S. (2001). *Mikrobiologi Dasar Diklat Kompilasi 28*. USU Press. Medan. 120 hlm.
- KKP (Kementerian Kelautan dan Perikanan). 2018. KKP: Budidaya Udang Masih Sangat Potensial. Diakses pada September 2021. <https://kkp.go.id/djpb/artikel/8688-kkp-budidaya-udang-masih-sangat-potensial>
- Kurniawansyah, I. S. (2016). Penentuan Tingkatan Jaminan Sterilitas pada Autoklaf dengan Indikator Biologi Spore Strip. *Farmaka*, 14(1), 59-69.
- Nurkasanah, S., dan N. Widodo. (2015). The Effect of Different Media Content on Protease Activity *Bacillus subtilis*. *Biotropika: Journal of Tropical Biology*, 3(2), 104-106.
- Perwendha, R., A. Oetari dan W. Sjamsuridzal. (2020). Skimmed milk-degrading ability of *Rhizopus azygosporus* UICC 539 at various temperatures. *AIP Conference Proceedings*, 2242(1), 050006.
- Poernomo, A. T., Isnaeni, I., Agus, D., Dewi, A. C., & Suryagama, D. 2017. Pengaruh nutrisi pada produksi dan karakterisasi protease dari bakteri termofilik isolat LS-1 lumpur Sidoarjo. *Jurnal Farmasi dan Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 4(2): 51-58.
- Putri, A. L., P. Lisdiyanti dan M. Kusmiati. (2018). Identifikasi Aktinomisetes Sedimen Air Tawar Mamasa, Sulawesi Barat dan Aktivitasnya Sebagai Antibakteri dan Pelarut Fosfat. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia (JBBI)*, 5(2), 139-148.
- Razzaq, A., S. Shamsi, A. Ali, Q. Ali, M. Sajjad, A. Malik dan M. Ashraf. (2019). Microbial Proteases Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 110(7), 1-20.

- Rudiyanti, S., Halimah, H.N., dan Haeruddin. 2009. Analisa Beban Pencemaran Kegiatan Budidaya Tambak Bandeng di Sungai Pasar Banggi Kabupaten Rembang.
- Sengupta, S., A. Pramanik, A. Ghosh dan M. Bhattacharyya. (2015). Antimicrobial Activities of Actinomycetes Isolated from Unexplored Regions of Sundarbans Mangrove Ecosystem. BMC microbiology, 15(1), 170.
- Sivanandhini, T., Ramasamy, Subbaiya., M. Gopinath., J. Angrasan., T. Kabilan dan M. Selvam. (2015). An Investigation On Morphological Characterization Of Actinomycetes Isolated From Marine Sediments. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 6(2), 1234-1243.
- Suryadi, Y., T. P. Priyatno, I. Samudra, D. N. Susilowati, N. Lawati dan E. Kustaman. (2013). Pemurnian Parsial dan Karakterisasi Kitinase Asal Jamur Entomopatogen *Beauveria bassiana* isolat BB200109. J. Agro Biogen., 9(2), 77-84.
- Syafie, Y., S. Triatmojo dan A. Pratiwiningrum. (2013). Penggunaan Protease *Aspergillus* sp. dan *Rhizopus* sp. dengan Konsentrasi yang Berbeda dalam Tahapan Unhairing terhadap Kualitas Fisik dan Limbah Cair pada Penyamakan Kulit Domba. Buletin Peternakan, 37(3), 198-206.
- Tefarani, R., N.K.T. Martuti dan S. Ngabekti. (2019). Keane ragaman spesies mangrove dan zonasi di wilayah Kelurahan Mangunharjo Kecamatan Tugu Kota Semarang. Life Science, 8(1), 41-53.
- Tennalli, G., B. Udupudi dan P. Naik. (2012). Isolation of Proteolytic Bacteria and Characterization of Their Proteolytic Activity. International Journal of Advances in Engineering, Science and Technology (IJAESt), 2(3).
- Todar, K. 2007. Nutrition and Growth of Bacteria in Todar's Online Textbook of Bacteriology. Wisconsin: University Wisconsin-Madison Departement of Bacteriology. 580 hal.
- Tuna, E. E. H., dan Uzel, A. (2007). Alkaline Protease Production by an Actinomycete MA1-1 Isolated from Marine Sediments. Annals of Microbiology, 57(1): 71-75.
- Wasteson, Y. dan E. Hornes. (2009). Pathogenic *Escherichia coli* Found in Food. International Journal of Food Microbiology, 12, 103-114.
- Wossink, Ada and Z. S. Denaux. 2002. Environmental Efficiency, Separability and Abatement Costs of Nonpointsource Pollution. AAEA Annual Meeting, July 28-31, 2002, Long Beach CA.