

OPTIMASI PERTUMBUHAN BAKTERI LAUT PENGHASIL PROTEASE MENGGUNAKAN VARIASI KONSENTRASI MEDIA SKIM MILK MODIFIKASI

Anita^{1*}, Hasnah Natsir², Ahyar Ahmad³, Paulina Taba⁴, Harningsih Karim⁵

^{1,3,4}*Teknologi Laboratorium Medis, Politeknik Muhammadiyah Makassar, Makassar*

²*Departemen Kimia, Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Hasanuddin, Makassar*

⁵*Departemen Farmasi, Fakultas Farmasi, YAMASI, Makassar*

*e-mail: anitadinar1983@gmail.com

ABSTRACT

This study aims to analyze the growth rate of marine bacteria producing protease using variations in the concentration of skim milk media and to observe the relationship between cell growth and enzyme activity. The study was conducted using three concentrations of skim milk media (1%, 2%, and 3%) and observation of growth and enzyme activity for 108 hours. The results showed that 1% skim milk concentration produced the largest proteolytic zone diameter (13.8 mm) with the fastest growth (1 day). Observations of cell growth patterns and enzyme activity showed that the highest enzyme activity (0.5933 U/mL) occurred in the early growth phase and decreased in subsequent phases even though cell growth increased. This indicates that there is no linear relationship between cell growth and enzyme activity in marine bacteria-producing protease, where enzyme production and activity are influenced by various complex factors such as physiological conditions of the cells and nutrient availability.

Keywords: marine bacteria, protease, growth pattern, modified skim milk

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis kecepatan pertumbuhan bakteri laut penghasil protease menggunakan variasi konsentrasi media skim milk dan mengamati hubungan antara pertumbuhan sel dengan aktivitas enzimnya. Penelitian dilakukan dengan menggunakan tiga konsentrasi media skim milk (1%, 2%, dan 3%) serta pengamatan pertumbuhan dan aktivitas enzim selama 108 jam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi skim milk 1% menghasilkan diameter zona proteolitik terbesar (13.8 mm) dengan pertumbuhan tercepat (1 hari). Pengamatan pola pertumbuhan sel dan aktivitas enzim menunjukkan aktivitas enzim tertinggi (0.5933 U/mL) terjadi pada fase awal pertumbuhan dan menurun pada fase-fase berikutnya meskipun pertumbuhan sel meningkat. Hal ini mengindikasikan bahwa tidak terdapat hubungan linear antara pertumbuhan sel dan aktivitas enzim pada bakteri laut penghasil protease, dimana produksi dan aktivitas enzimnya dipengaruhi oleh berbagai faktor kompleks seperti kondisi fisiologis sel dan ketersediaan nutrisi.

Kata Kunci: bakteri laut, protease, pola pertumbuhan, skim milk modifikasi

PENDAHULUAN

Laut Indonesia yang luas menyimpan keanekaragaman mikroorganisme yang sangat besar (Arianto 2020; Husen Osu Oheoputra et al. 2024; Salayan, Wulandari, and Huda 2024), termasuk bakteri yang memiliki potensi bioteknologi yang belum sepenuhnya tereksplorasi (Anggiani 2020; Khastini et al. 2022). Salah satu potensi yang menarik perhatian adalah kemampuan bakteri laut dalam menghasilkan enzim protease (Anggorowati, Munandar, and Indriana 2019; Hengkengbala et al. 2021). Protease merupakan enzim yang berperan penting dalam berbagai proses industri, seperti industri deterjen, penyamakan kulit, pengolahan makanan, dan farmasi (Aruna et al. 2023; Ojo Omoniyi, Dighitoghi Moro, and Bridget Afolabi 2024; Ramadan Matter 2023).

Dalam upaya mengoptimalkan produksi protease dari bakteri laut, pemilihan media pertumbuhan yang tepat menjadi faktor krusial (Aruna et al. 2023; Sultana and Joseph 2024). Media skim milk telah dikenal sebagai media yang umum digunakan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi bakteri penghasil protease (Asha and Palaniswamy 2018; Masi, Gemechu, and Tafesse 2021). Namun, modifikasi pada komposisi media skim milk dapat memberikan pengaruh yang signifikan terhadap kecepatan pertumbuhan bakteri dan produksi enzim protease (Wa et al. 2022).

Bakteri laut memiliki karakteristik yang unik karena telah beradaptasi dengan lingkungan laut yang spesifik, termasuk salinitas tinggi, tekanan hidrostatik, dan ketersediaan nutrisi yang fluktuatif (Poli et al. 2017; Segaran et al. 2023). Kemampuan adaptasi ini mempengaruhi kebutuhan nutrisi dan kondisi optimal pertumbuhannya, sehingga media kultivasi standar seringkali perlu dimodifikasi untuk

mengakomodasi kebutuhan spesifik bakteri laut (Chauhan and Jindal 2020; Poli et al. 2017; Segaran et al. 2023).

Penggunaan media skim milk sebagai substrat untuk pertumbuhan bakteri penghasil protease telah banyak dilaporkan dalam berbagai penelitian (Shaikh et al. 2023). Kandungan protein yang tinggi dalam skim milk menjadikannya media yang ideal untuk menginduksi produksi protease (Nageswara, Guntuku, and Yakkali 2019; Salarizadeh et al. 2014). Namun, untuk bakteri laut, komposisi dasar media skim milk mungkin memerlukan penyesuaian untuk mencapai pertumbuhan dan produksi enzim yang optimal.

Modifikasi media skim milk dapat dilakukan melalui berbagai pendekatan, seperti penambahan mineral laut, pengaturan salinitas, atau suplementasi dengan sumber karbon dan nitrogen tambahan (Yu et al. 2024). Setiap modifikasi ini dapat memberikan efek yang berbeda pada kecepatan pertumbuhan bakteri dan kemampuannya dalam menghasilkan protease (Shaikh et al. 2023). Pemahaman tentang pengaruh modifikasi media terhadap pertumbuhan bakteri menjadi kunci dalam optimasi produksi enzim (Rabby et al. 2022).

Optimasi pertumbuhan bakteri laut pada media skim milk modifikasi tidak hanya bertujuan untuk meningkatkan efisiensi produksi protease, tetapi juga memberikan alternatif media yang lebih ekonomis. Pemahaman mendalam tentang faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri dan produksi protease, seperti konsentrasi nutrisi, pH, suhu, dan salinitas, menjadi kunci keberhasilan dalam pengembangan media yang optimal.

Penelitian ini bertujuan untuk mengoptimalkan pertumbuhan bakteri laut penghasil protease menggunakan media skim milk modifikasi untuk



mendapatkan komposisi media yang optimal dan menghasilkan aktivitas proteolitik yang tinggi.

BAHAN DAN METODE

Adapun alat yang digunakan adalah autoklaf (Hirayama HVE-50), inkubator shaker (Stuart SI500), spektrofotometer UV-Vis (Thermo Scientific Genesys 10S), dan mikroskop binokuler (Olympus CX23), timbangan analitik (Ohaus Pioneer), pH meter digital (Hanna HI2211), erlenmeyer berbagai ukuran (50 mL, 100 mL, 250 mL, dan 500 mL), tabung reaksi, cawan petri, pipet mikro (100-1000 μ L), jarum ose, bunsen, gelas ukur, dan gelas beaker.

Sedangkan bahan-bahan yang digunakan terdiri dari isolat bakteri laut MS-L5 yang diperoleh dari koleksi laboratorium Biokima Departemen Kimia, Universitas Hasanudin, media pertumbuhan yang terdiri dari skim milk bubuk (Difco) sebagai substrat utama, casein (Difco), yeast extract (Oxoid) 0,5%, pepton (Oxoid) 0,5%, dan garam-garam mineral meliputi NaCl 3%, KH_2PO_4 0,1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05%, dan CaCl_2 0,01%, aquades steril, alkohol 70%, media Nutrient Agar dan Nutrient Broth (Oxoid) untuk pemeliharaan kultur, kertas saring Whatman No.1, aluminium foil, kapas, dan plastik wrap.

METODE

A. Persiapan Media Skim Milk Modifikasi dan Peremajaan Isolat

Media skim milk modifikasi dibuat dengan komposisi skim milk bubuk 1%, 2% dan 3%, serbuk agar 1%, yeast extract 0,5%, pepton 0,5%, NaCl 0,5 %, Semua bahan dilarutkan dalam air laut steril dan pH media diatur menjadi 7,0. Media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Isolat bakteri laut penghasil protease diremajakan pada media Nutrient Agar miring yang dilarutkan air laut steril dan

diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam.

B. Pembuatan Inokulum

Satu ose kultur bakteri MS-L5 dari media NA miring diinokulasikan ke dalam 50 mL media inokulum dengan casein sebagai substrat dan diinkubasi dalam inkubator shaker dengan kecepatan 180 rpm pada suhu ruang selama 24 jam.

C. Optimasi Pertumbuhan Bakteri

Optimasi pertumbuhan dilakukan dengan menginokulasikan 5% (v/v) kultur inokulum ke dalam 100 mL media casein. Kultivasi dilakukan dalam inkubator shaker dengan kecepatan 180 rpm pada suhu ruang. Pengambilan sampel dilakukan setiap 12 jam selama 108 jam untuk pengukuran:

1. Pertumbuhan Sel

Pertumbuhan sel diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm. Kurva pertumbuhan dibuat dengan memplotkan nilai OD600 terhadap waktu inkubasi.

2. Aktivitas Protease

Aktivitas protease diukur menggunakan metode Kunitz yang dimodifikasi. Sampel disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan digunakan sebagai sumber enzim kasar.

D. Analisis Data

Data pertumbuhan sel, aktivitas protease, dianalisis untuk menentukan:

- Fase-fase pertumbuhan bakteri
- Waktu optimal produksi protease
- Korelasi antara pertumbuhan sel, dan aktivitas protease

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian tentang kecepatan pertumbuhan bakteri laut penghasil protease menggunakan media skim milk modifikasi 1%, 2 % dan 3 %. Dari hasil pengamatan tersebut dilakukan pengamatan kecepatan pertumbuhan bakteri penghasil protease (Tabel 1).



Tabel 1. Perbandingan Diameter Zona Proteolitik

Konsentrasi Media	Diameter Zona Proteolitik (mm)	Kecepatan Pertumbuhan (Hari)
Skim milk 1%	13.8	1
Skim milk 2 %	11.3	3
Skim milk 3 %	11.2	5

Pada Tabel. 1. menampilkan perbandingan konsentrasi media skim milk dengan diameter zona proteolitik dan kecepatan pertumbuhan, dimana terlihat bahwa konsentrasi skim milk 1% menghasilkan diameter zona proteolitik terbesar (13.8 mm) dengan kecepatan pertumbuhan tercepat (1 hari), diikuti skim milk 2% dengan diameter 11.3 mm dan pertumbuhan 3 hari, serta skim milk 3% yang menghasilkan diameter terkecil (11.2 mm) dengan pertumbuhan terlama (5 hari), menunjukkan bahwa konsentrasi skim milk yang lebih rendah justru memberikan hasil yang lebih optimal dalam hal diameter zona proteolitik dan kecepatan pertumbuhan.

Fenomena ini kemungkinan disebabkan karena pada konsentrasi skim milk yang lebih rendah, enzim proteolitik yang dihasilkan oleh mikroorganisme dapat bekerja lebih efektif dalam mendegradasi protein, sehingga menghasilkan zona bening (zona proteolitik) yang lebih besar. Sebaliknya, pada konsentrasi skim milk yang lebih tinggi, mungkin terjadi hambatan dalam aktivitas enzim proteolitik karena substrat yang terlalu pekat, yang mengakibatkan zona proteolitik lebih kecil dan pertumbuhan mikroorganisme menjadi lebih lambat. Data ini memberikan informasi penting untuk optimasi kondisi media dalam menghasilkan enzim proteolitik.

Selanjutnya dilakukan pengamatan pola pertumbuhan bakteri selama 108 jam dan pengukuran aktivitas enzim (Tabel 2). Hasil pengamatan menunjukkan pola pertumbuhan yang dapat dibagi menjadi

beberapa fase pertumbuhan yang berbeda.

Pola pertumbuhan bakteri laut yang ditunjukkan dalam tabel memperlihatkan dinamika yang menarik antara pertumbuhan sel dan aktivitas enzim selama periode inkubasi 108 jam. Pada fase awal pertumbuhan atau fase lag (0-12 jam), bakteri menunjukkan peningkatan nilai OD dari 0.224 menjadi 0.550, mengindikasikan bahwa sel-sel bakteri sedang beradaptasi dengan lingkungan barunya. Pada fase ini, aktivitas enzim tercatat paling tinggi yaitu 0.5933 U/mL dan sedikit menurun menjadi 0.5547 U/mL, menunjukkan bahwa bakteri aktif memproduksi enzim untuk mempersiapkan fase pertumbuhan selanjutnya.

Memasuki fase eksponensial (12-36 jam), pertumbuhan sel terus meningkat hingga mencapai OD 0.720, menandakan terjadinya pembelahan sel yang aktif. Namun, menariknya aktivitas enzim justru mengalami penurunan menjadi 0.4917 U/mL. Hal ini mungkin terjadi karena sel bakteri lebih memfokuskan energinya untuk proses pembelahan sel daripada produksi enzim. Setelah itu, bakteri mengalami fase kematian (36-72 jam) yang ditandai dengan penurunan drastis nilai OD hingga 0.210, meskipun demikian aktivitas enzim tetap stabil pada kisaran 0.44-0.47 U/mL.

Fenomena yang paling menarik terjadi pada fase pertumbuhan sekunder (72-108 jam), dimana terjadi peningkatan dramatis nilai OD dari 0.210 menjadi 1.460. Peningkatan ini kemungkinan disebabkan oleh sel-sel yang bertahan hidup mengalami pertumbuhan baru



dengan memanfaatkan nutrisi dari sel-sel yang mati sebelumnya. Meski pertumbuhan sel meningkat tajam, aktivitas enzim justru terus menurun hingga mencapai 0.3429 U/mL pada akhir masa inkubasi. Penurunan ini

biasanya disebabkan oleh beberapa faktor seperti akumulasi produk metabolit yang menghambat aktivitas enzim, degradasi enzim, atau perubahan metabolisme sel.

Tabel 2. Hasil Pengamatan Pertumbuhan Bakteri dan Aktivitas Protease

Waktu Inkubasi	Pertumbuhan Sel (OD)	Aktivitas Enzim (U/mL)
0	0.224	0.5933
12	0.550	0.5547
24	0.635	0.446
36	0.720	0.4917
48	0.254	0.4399
60	0.250	0.4277
72	0.210	0.4775
84	1.460	0.4714
96	1.420	0.3525
108	1.460	0.3429

Hasil pengamatan ini menunjukkan bahwa hubungan antara pertumbuhan sel bakteri dan aktivitas enzimnya tidak selalu berbanding lurus. Aktivitas enzim tertinggi justru terjadi pada awal pertumbuhan ketika jumlah sel masih relatif rendah, sementara pada saat pertumbuhan sel mencapai puncaknya, aktivitas enzim justru berada pada level yang lebih rendah. Hal ini mengindikasikan bahwa produksi dan aktivitas enzim pada bakteri laut ini dipengaruhi oleh berbagai faktor kompleks yang melibatkan kondisi fisiologis sel, ketersediaan nutrisi, dan kemungkinan adanya mekanisme regulasi yang mengontrol ekspresi enzim.

KESIMPULAN

Penelitian ini menunjukkan konsentrasi skim milk 1% memberikan hasil optimal dengan zona proteolitik terbesar dan pertumbuhan tercepat. Selama pengamatan 108 jam, aktivitas enzim tertinggi terjadi pada fase awal pertumbuhan dan menurun pada fase

berikutnya meskipun pertumbuhan sel meningkat, menunjukkan tidak ada hubungan linear antara pertumbuhan sel dan aktivitas enzim bakteri laut.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis dapat menambahkan ucapan terimakasih kepada pihak-pihak yang telah membantu pelaksanaan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Anggiani, Milani. 2020. Potensi Mikroorganisme Sebagai Agen Bioremediasi Mikroplastik Di Laut. *Oceana*. 45(2): 40–49.
- Anggorowati, Dien Arista, Hendra Munandar, and Lisa Fajar 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

- Arianto, Mukhamad Fredy. 2020. Potensi Wilayah Pesisir Di Negara Indonesia. *Jurnal Geografi*. 20(20): 1–7.
- Aruna, Valmiki, V Chandrakala, Gangadhara Angajala, and E R Nagarajan. 2023. Proteases: An Overview of Its Recent Industrial Developments and Current Scenario in the Revolution of Biocatalysis. *Materials Today: Proceedings*. 92: 565–73.
- Asha, B., and M. Palaniswamy. 2018. Optimization of Alkaline Protease Production by *Bacillus cereus* FT 1 Isolated from Soil. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 8(2): 119–27.
- Chauhan, Abhishek, and Tanu Jindal. 2020. Microbiological Culture Media: Types, Role, and Composition. In *Microbiological Methods for Environment, Food and Pharmaceutical Analysis*. Cham: Springer International Publishing. 23–66.
- Hengkengbala, Sabrina I., et al. 2021. Karakteristik Morfologi Dan Aktivitas Enzim Protease Bakteri Simbion Nudibranch. *Jurnal Pesisir Dan Laut Tropis*. 9(3): 83.
- Husen Osu Oheoputra., et al. 2024. Potensi Dan Pengelolaan Sumber Daya Kelautan Indonesia. *Kamiya Jaya Aquatic*. 101–110.
- Khastini, Rida Oktorida, Laila Rahma Zahranie, Risma Aulia Rozma, and Yolanda Ade Saputri. 2022. Review: Peranan Bakteri Pendegradasi Senyawa Pencemar Kelautan Tropis. 11(2): 377–86.
- Lingkungan Melalui Proses Bioremediasi. *Bioscientist: Jurnal Ilmiah Biologi*. 10(1): 345.
- Masi, Chandran, Getachew Gemechu, and Mesfin Tafesse. 2021. Isolation, Screening, Characterization, and Identification of Alkaline Protease-Producing Bacteria from Leather Industry Effluent. *Annals of Microbiology*. 71(1): 24.
- Nageswara, Swathi, Girijasankar Guntuku, and Bhagya Lakshmi Yakkali. 2019. Purification, Characterization, and Structural Elucidation of Serralysin-like Alkaline Metalloprotease from a Novel Source. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 17(1): 1–15.
- Ojo Omoniyi, Olusola Abayomi, Dauphin Dighitoghi Moro, and Oyinkansola Bridget Afolabi. 2024. Microbial Proteases: Sources, Significance and Industrial Applications. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 13(6): 1–23.
- Poli, Annarita., et al. 2017. Microbial Diversity in Extreme Marine Habitats and Their Biomolecules. *Microorganisms*. 5(2).
- Rabby, Md Raisul Islam., et al. 2022. A Combined Study on Optimization, in Silico Modeling, and Genetic Modification of Large-scale Microbial Cellulase Production. *Biochemistry Research International*. 21 (12) : 2022:4598937
- Ramadan Matter, Ikhlas. 2023. Industrial Applications of Microbial Protease:



A Review. *Academic Science journal*.1(3): 141–60.

Salarizadeh, Navvabeh, Sadegh Hasannia, Kambiz Akbari Noghabi, and Reza Hassan Sajedi. 2014. Purification and Characterization of 50 KDa Extracellular Metalloprotease from *Serratia Sp.* ZF03. *Iranian Journal of Biotechnology*. 12(3).

Salayan, Lia Mandalika, Heni Wulandari, and Muhammad Komarul Huda. 2024. Peran Ekosistem Laut Dalam Konservasi Keanekaragaman Hayati Di Indonesia. *Journal of Natural Sciences*. 5(3):234-244

Segaran, Thirukanthan Chandra, Mohamad Nor Azra, Fathurrahman Lananan, and Youji Wang. 2023. Microbe, Climate Change, and Marine Environment: Linking Trends and Research Hotspots. *Marine Environmental Research*. 189: 106015.

Shaikh, Ibrahim Ahmed. et al. 2023. Extracellular Protease Production, Optimization, and Partial Purification from *Bacillus nakamurai* PL4 and Its Applications. *Journal of King Saud University – Science*. 35(1): 102429.

Sultana, Rasiya, and Imelda Joseph. 2024. Marine Protease-Producing Bacteria as Potential Probiotics for Advancing Marine Culture. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 61: 103392.

We, Yunchao., et al. 2022. Extracellular Polysaccharide Extraction from *Streptococcus thermophilus* in Fermented Milk. *Microbiology spectrum*. 10(2): e0228021.

Yu, Hongsen, et al. 2024. Effects and Improvement Mechanisms of Ultrasonic Pretreatment on the Quality of Fermented Skim Milk. *Ultrasonic sonochemistry*. 108-106958.

