

IV. METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Diponegoro, Semarang. Penelitian dilakukan pada bulan Maret 1994 sampai dengan Juli 1994.

B. Bahan dan alat penelitian

1. Bahan Penelitian.

- a. sampel tanah limbah tahu
- b. medium umum untuk pertumbuhan bakteri :
nutrien agar dan nutrien broth
- c. medium untuk hidrolisis protein : skim milk agar, nutrien gelatin, trypton broth (pengujian indol), triple sugar iron agar (pembentukan H₂S)
- d. medium untuk hidrolisis pati : starch agar
- e. medium untuk fermentasi karbohidrat :
lactosa broth, glucosa broth, sucrosa broth, arabinosa broth
- f. medium untuk pengujian merah metil dan Voges Proskauer : methyl red broth
- g. medium untuk reduksi nitrat : nitrate broth
- h. medium untuk pengujian penggunaan sitrat : Simmon Citrat Agar

- i. cat gram (gram A, B, C, D)
- j. cat spora (klein A, B, C)
- k. indikator bromtimol biru
- l. indikator merah metil
- m. reagen untuk reduksi nitrat : asam sulfanilat, dimetil α -naftilamin
- n. reagen untuk pengujian voges proskauer : KOH 40% dan α -naftol
- o. reagen untuk pengujian indol : kovac's
- p. larutan HgCl₂ 3%
- r. minyak emersi
- s. alkohol
- t. vaselin
- u. akuades

2. Alat Penelitian.

- a. botol sampel steril
- b. autoklaf
- c. pemanas air
- d. inkubator
- e. oven
- f. mikroskop dan perlengkapannya
- g. termometer
- h. tabung reaksi dan tabung Durham
- i. cawan petri
- j. erlenmeyer
- k. gelas ukur
- l. kaca pembesar

- m. pengaduk, pipet ukur dan pipet tetes
- n. bunsen, ose (ujung runcing dan ujung tumpul)
- o. gelas benda, gelas benda bagain tengah cekung, dan gelas penutup.

C. Cara kerja

1. Pengambilan Sampel.

Sampel tanah diambil di sekitar tempat pembuangan limbah tahu di daerah Tandang, Kelurahan Jomblang, Semarang.

Pengambilan sampel dilakukan secara acak pada tiga lokasi yaitu lokasi A dekat perakaran tanaman, lokasi B dekat dengan pembuangan sampah dan lokasi C jauh dari pembuangan sampah dan perakaran tanaman. Tiap lokasi dibagi menjadi beberapa petak, kemudian diberi nomor. Dilakukan pengundian untuk menentukan petak mana yang akan dipilih. Dari petak yang terpilih diambil sampel tanah kurang lebih 25 gram (Subba Rao, 1977) dan dimasukkan ke dalam botol sampel steril.

2. Isolasi Bakteri *Bacillus sp.*

Sampel tanah dalam botol sampel steril diberi akuades steril sebanyak 225 ml, kemudian dikocok selama 10 menit dan didiamkan sebentar agar tanah mengendap.

Akuades yang tersuspensi dengan tanah tersebut dituang ke dalam erlemeyer dan dipanaskan pada suhu 80°C selama 10 sampai 30 menit (Brock, 1984).

Dibuat seri pengenceran seencer mungkin dengan maksud agar koloni yang tumbuh akan tersebar sehingga memudahkan dalam mengisolasi. Sebanyak satu mililiter dari pengenceran tersebut diinokulasikan ke dalam cawan petri. Medium nutrisi agar yang telah dicairkan dituang ke dalam cawan petri ± 12 ml, lalu digoyangkan hati-hati agar suspensi pengenceran tercampur rata dengan medium, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dan 50°C selama 48 sampai 72 jam (inkubasi mesofil dan termofil).

Diamati pertumbuhan koloni pada permukaan medium. Dilakukan isolasi pada tiap-tiap koloni yang tampak berbeda dengan menggunakan jarum ose, kemudian digoreskan pada medium miring nutrisi agar dan diinkubasi pada suhu 37°C dan 50°C (inkubasi mesofilik dan termofilik) selama 48 jam.

Dilihat adanya pertumbuhan, kemudian pada masing-masing koloni yang tumbuh dilakukan isolasi dari medium miring nutrisi agar yang satu ke medium miring nutrisi agar lainnya diinkubasi dengan suhu yang sama dan waktu inkubasi yang sama, begitu seterusnya sampai diperoleh isolat murni.

Setelah diperoleh isolat murni, dibuat goresan isolat baru pada medium miring nutrisi agar dan

disimpan sebagai stok isolat. Cara ini dilakukan untuk sampel dari lokasi A, B dan C.

3. Pengamatan Morfologi dan Pengujian Biokimia.

Setelah diperoleh isolat bakteri, dilakukan pengamatan morfologi koloni dan sel, serta beberapa uji biokimia terhadap isolat, untuk mendapatkan sifat-sifat karakteristiknya, yang berguna dalam identifikasi bakteri.

Pengamatan morfologi koloni dan sel, serta pengujian biokimia berdasarkan buku Laboratory Manual on Fundamental Principles of Bacteriology; buku Microbiology Laboratory Manual dan buku Manual for The Identification of Medical Bacteria. Sedangkan identifikasinya menggunakan buku Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.

Pengamatan morfologi koloni meliputi ; bentuk, warna, keadaan tepi, permukaan dan diameter koloni. Pengamatan morfologi sel meliputi pengamatan Gram dan Acid Fast, pengamatan spora. Kemudian dilanjutkan dengan pengamatan motilitas dan uji biokimia yang meliputi :

- a. uji pemecahan protein, yaitu uji hidrolisis kasein, uji hidrolisis gelatin, uji pembentukan indol dan uji pembentukan gas H_2S
- b. uji hidrolisis amilum
- c. uji pembentukan katalase

- d. uji fermentasi karbohidrat (glukosa, laktose, sukrosa dan arabinosa)
- e. uji merah metil dan voges proskauer
- f. uji reduksi nitrat
- g. uji penggunaak sitrat
- h. uji pertumbuhan anaerob.

3.1. Pengamatan Morfologi Sel Isolat Bacillus .

Pengecatan Gram. Dibuat olesan (smear) tipis isolat pada gelas benda, kemudian difiksasi dengan melewatkannya beberapa kali pada nyala api. Cat gram A diteteskan pada olesan bakteri dan dibiarkan selama satu menit, kemudian dicuci dengan air mengalir. Cat Gram B diteteskan dan dibiarkan selama satu menit kemudian dicuci dengan air mengalir. Cat Gram C diteteskan dan dibiarkan selama 30 detik kemudian dicuci dengan air mengalir. Cat Gram D diteteskan dan dibiarkan selama 2 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir. Gelas benda dikeringanginkan. Selama kering diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran lemah kemudian dengan pembesaran kuat, dan sebelumnya ditetesi dengan minyak emersi (Salle, 1973).

Pengecatan Tahan Asam (Acid Fast). Dibuat olesan tipis isolat pada gelas benda, kemudian difiksasi dengan melewatkannya beberapa kali pada nyala api. Olesan ditetesi dengan ZN A

selama 5 - 10 menit dan dibantu dengan pemanasan. Setelah dingin dibilas dengan air, dikeringanginkan dan ditetesi dengan larutan peluntur (ZN B) sampai zat peluntur yang mengalir tampak berwarna kemerahan. Dicuci dengan air dan dikeringanginkan, kemudian ditetesi dengan cat penutup (ZN C) selama 30 detik. Dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Diamati di bawah mikroskop. Bakteri yang bersifat acid fast tampak berwarna merah sedangkan yang bersifat non acid fast tampak berwarna biru (Pelczar, 1977).

Pengecatan Spora. Dibuat olesan tipis isolat dari biakan dalam medium nutrien broth berumur 4 hari, kemudian difiksasi dengan melewati beberapa kali pada nyala api. Ditetaskan larutan Klein A secara berlebihan kemudian dipanaskan pada bunsen sampai tampak beruap tapi tidak mendidih. Dibiarkan selama 5 menit kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Ditetesi dengan larutan Klein B sampai warna cat tepat dilunturkan, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Ditetesi dengan larutan Klein C, dibiarkan selama 2 menit, kemudian dikeringanginkan. Setelah kering diamati di bawah mikroskop. Diamati letak spora, bentuk

spora dan ukurannya terhadap sel bakteri (Hendarko Sriani *dkk*, 1990).

3.2. Pengamatan Motilitas

Gelas benda yang tengahnya cekung dan penutupnya dibersihkan dengan alkohol agar bebas lemak, kemudian dipanggang di atas api bunsen. Diambil satu ose isolat dari medium nutrien broth umur 12 - 18 jam secara aseptis dan diletakan pada gelas penutup. Pada empat sudut gelas penutup diteteskan sedikit vaselin. Gelas benda cekung ditutupkan ke atas gelas penutup dengan menempatkan suspensi biakan tepat di tengahnya.

Diamati dibawah mikroskop apakah terlihat adanya pergerakan bakteri (Hendarko Sriani *dkk*, 1990).

3.3. Pengujian Biokimia Isolat

Pengujian katalase. Diteteskan sedikit larutan H_2O_2 3% pada gelas benda. Diambil sedikit isolat dan diletakkan diatas gelas benda. Diamati terjadinya gelembung - gelembung udara pada tetesan larutan H_2O_2 yang manunjukkan reaksi katalase positif.

Pengujian hidrolisis protein dengan medium skim milk agar yang mengandung kasein. Diambil sedikit isolat dengan menggunakan ujung ose runcing, kemudian disuspensikan dengan 9 ml

akuades steril dalam tabung reaksi. Diambil satu oae suspensi tersebut dan diinokulasikan kedalam cawan petri. Medium skim milk agar yang telah dicairkan dituang kedalam cawan petri. cawan petri digoyangkan hati-hati agar suspensi medium tercampur rata kemudian dibiarkan hingga memadat, dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 48 jam. Diamati adanya daerah bening disekitar pertumbuhan koloni, yang menunjukkan terjadinya hidrolisis kasein. Cara ini juga dilakukan terhadap bakteri pembanding yaitu *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Kemudian diukur diameter daerah bening dan diameter koloni isolat. Perbandingan antara diameter daerah bening dan diameter koloni disebut rasio aktivitas hidrolisis. Setelah diukur, rasio aktivitas hidrolisis isolat dibandingkan dengan rasio aktivitas hidrolisis *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (Salle, 1973; Cappucino, et al, 1983).

Pengujian dengan medium nutrisi gelatin.

Medium agar tegak nutrisi gelatin diinokulasi dengan biakan isolat dengan cara tusukan (stab), menggunakan ose yang berujung runcing. Medium diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 jam, kemudian disimpan dalam almari es bersuhu dibawah 10°C selama 2 sampai 3 jam untuk

mengetahui apakah terjadi hidrolisis atau tidak. Bila setelah 2 sampai 3 jam dalam almari es medium tetap cair, maka reaksi positif (terjadi hidrolisis protein gelatin), tetapi bila memadat kembali berarti reaksi negatif (tidak terjadi hidrolisis protein gelatin). Cara ini diulang sampai biakan berumur 48 jam dengan tiap 18 jam sekali disimpan dalam almari es (Cowan and Steels, 1974).

Pengujian pembentukan indol. Disiapkan medium triptone broth dalam tabung reaksi, kemudian diinokulasi dengan satu ose isolat kedalam tabung tersebut. Medium kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi, medium ditetesi dengan reagen Kovac's 5 - 10 tetes. Reaksi terbentuknya indol diperlihatkan dengan terjadinya lapisan cincin yang berwarna merah pada permukaan medium (Cowan and Steels, 1974).

Pengujian pembentukan H₂S. Medium TSIA agar miring dan agar tegak dalam satu tabung, diinokulasi dengan isolat dengan cara goresan (streak) pada bagian agar yang miring, dan dengan cara tusukan (stab) pada bagian agar yang tegak. Medium diinkubasi pada suhu 37°C selama 7 hari. Diamati adanya perubahan warna

medium dari merah menjadi kuning yang berarti terjadi fermentasi gula pada medium. Diamati pula pertumbuhan koloni disepanjang tusukan inokulasi dan terjadinya terbentuknya warna hitam. Warna hitam ini merupakan H_2S yang bereaksi pada Fe dari medium (Salle, 1973).

Pengujian hidrolisis pati. Diambil sedikit isolat dengan menggunakan ose ujung runcing, kemudian disuspensikan dengan 9 ml akuades steril dalam dalam tabung reaksi. Diambil satu ose suspensi tersebut dan diinokulasikan ke dalam cawan petri. Dituangkan medium agar pati yang sebelumnya sudah dicairkan, kedalampetri sebanyak 12 ml. Cawan petri kemudian diinkubasi pada suhu $37^{\circ}C$ selama 48 jam. Setelah 48 jam diamati adanya pertumbuhan kemudian ditetesi dengan larutan lugol iodin (gram B). Bila disekitar pertumbuhan koloni terlihat adanya daerah bening, ini menunjukkan terjadinya hidrolisis amilum (Salle, 1973).

Pengujian fermentasi karbohidrat. Disiapkan tabung reaksi berisi medium fermentasi kaldu laktosa, glukosa, sukrosa dan arabinosa yang telah diberi indikator biru brom timol dan diisi tabung durham. Diambil satu ose isolat, diinokulasikan kedalam tabung tersebut. Tabung diinkubasi selama 48 jam pada suhu $37^{\circ}C$.

Diamati perubahan warna, adanya kekeruhan dan terbentuknya gas dalam tabung Durham. Perubahan warna dan kekeruhan menunjukkan terjadinya fermentasi karbohidrat dengan menghasilkan asam, sedang terbentuknya gas merupakan hasil lain dari fermentasi (Salle, 1973).

Pengujian reduksi nitrat. Medium kaldu nitrat dalam tabung reaksi, diinokulasi dengan satu ose biakan isolat. Tabung sebelumnya sudah diberi tabung Durham. Tabung-tabung yang sudah diinokulasi diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Diamati apakah terdapat gas dalam tabung Durham. Ditambahkan satu tetes Reagen asam sulfanilat dan satu tetes naftilamin. Adanya nitrat ditunjukkan dengan terbentuknya warna pink atau merah (Cappucino *et al*, 1983).

Pengujian merah metil. Medium kaldu merah metil dalam tabung reaksi diinokulasi dengan biakan isolat, dengan menggunakan ose. Tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 120 jam (5 hari). Diamati terjadinya perubahan warna, setelah ditambahkan beberapa tetes indikator merah metil kemudian dikocok. Terjadinya perubahan warna dari jernih menjadi merah karena terbentuknya sejumlah asam dari hasil karbohidrat yang terfermentasi (Salle, 1973).

Pengujian voges proskauer. Medium kaldu merah metil dalam tabung reaksi diinokulasi dengan satu ose biakan isolat. Tabung diinkubasi selama 120 jam (5 hari) pada temperatur 37°C. Diamati adanya perubahan warna kekuningan menjadi kemerahan, setelah ditambah indikator a-naftol dan larutan KOH 40%, kemudian dikocok. Perubahan ini dapat diamati setelah dibiarkan 2-4 jam (Cowan and Steel, 1974).

Pengujian penggunaan sitrat. Medium miring agar sitrat Simon diinokulasi dengan isolat, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 7 hari. Diamati adanya pertumbuhan dan perubahan warna medium dari hijau menjadi biru, yang berarti isolat mampu menggunakan sodium sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon (Salle, 1973).

Pengujian pertumbuhan anaerobik. Diambil satu ose isolat dan diinokulasikan ke medium nutrien agar dalam cawan petri, secara goresan (sreak), kemudian diinkubasi secara anaerob dalam anaerobik jar 35°C selama 48 jam. Setelah diinkubasi dilihat apakah terjadi pertumbuhan koloni pada medium tersebut (Pelczar dan Chan, 1977).

V. HASIL

A. Tahap Isolasi Dan Pengamatan Morfologi

Pada tahap isolasi dari tiga sampel tanah diperoleh 22 isolat dan ini dapat dilihat pada tabel 02. Sedangkan ciri-ciri morfologi koloni isolat dapat dilihat pada lampiran 01.

Tabel 02. Isolat Yang Diperoleh dari Tiga Sampel Tanah di Sekitar Pembuangan Limbah Tahu

Lokasi Pengambilan Sampel	Kode Isolat	Jumlah
A	N-A1, N-A2, N-A3, N-A4, N-A5 N-A6, N-A7	7
B	N-B1, N-B2, N-B3, N-B4, N-B5 N-B6	6
C	N-C1, N-C2, N-C3, N-C4, N-C5 N-C6, N-C7, N-C8, N-C9	9

Sumber : Data primer oleh Noorlanyati, 1994

Semua isolat yang diperoleh diamati morfologi sel dan sporanya, dilakukan pengujian motilitas dan katalase, dan berdasarkan Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, semua isolat termasuk genus *Bacillus* (lampiran 02).

B. Tahap Pengujian Proteolisis dan Biokimia (Fisiologis)

Semua isolat yang diperoleh kemudian diuji kemampuannya untuk menghasilkan protease. Besarnya kemampuan untuk menghasilkan enzim protease dapat dilihat dari pengujian yang menggunakan medium skim milk agar.

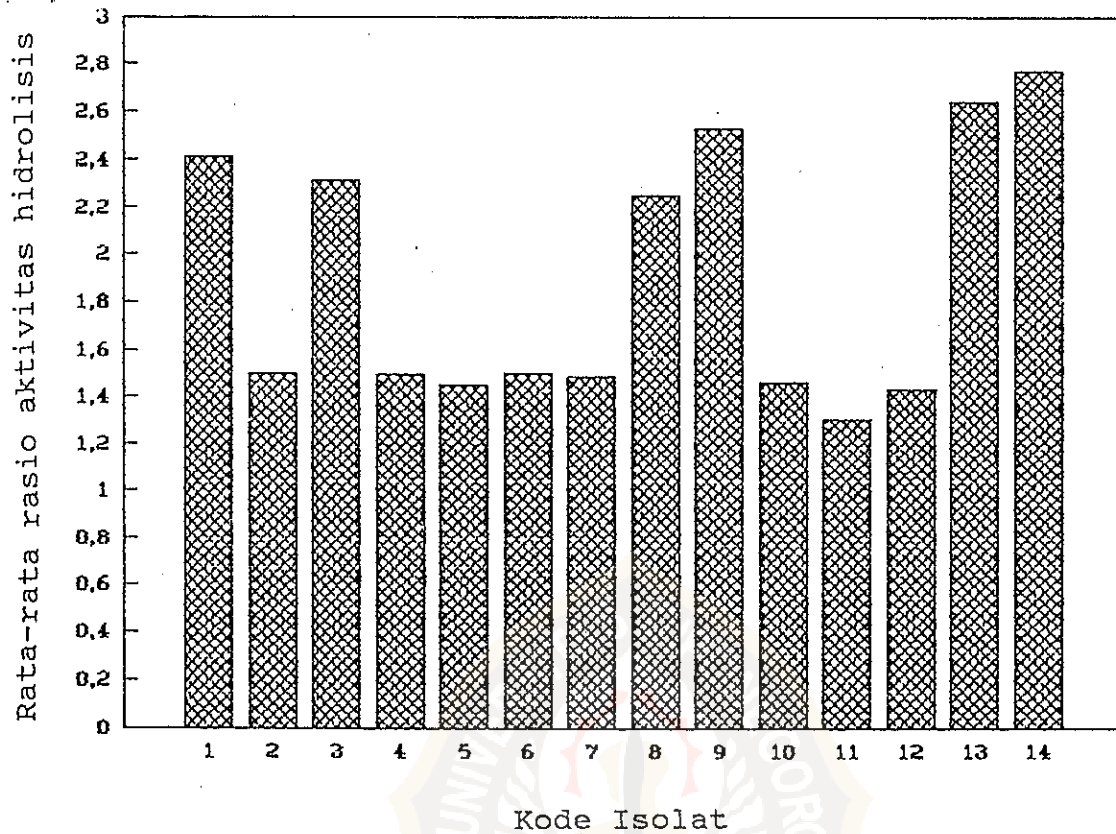
Dari 22 isolat ternyata hanya 13 isolat yang mampu menghasilkan enzim protease dan besarnya rasio aktivitas proteolisis (hidrolisis kasein dalam medium skim milk agar) dapat dilihat pada tabel 03 dan gambar 03. Untuk selanjutnya hanya pada 13 isolat ini saja yang dilakukan uji-uji biokimia (fisiologi), selanjutnya hasilnya dapat dilihat pada tabel 04.

Tabel 03. Rata-rata Rasio Aktivitas Hidrolisis dari Isolat pada Medium Skim Milk Agar Setelah Inkubasi 37 C Selama 36 Jam.

Kode Isolat	Rata-rata rasio aktivitas hidrolisis
N-A1	2,41
N-A2	1,50
N-A7	2,31
N-B1	1,49
N-B2	1,45
N-B3	1,50
N-B5	1,48
N-B6	2,25
N-C3	2,53
N-C4	1,46
N-C5	1,30
N-C7	1,43
N-C9	2,64
B.s	2,77

Sumber : data primer oleh Noorlanyati
 Keterangan : Kode B.s adalah untuk bakteri pembanding yaitu *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Gambar 03. Histogram Rata-rata Rasio Aktivitas Hidrolisis Isolat pada Medium Skim Milk Agar Setelah Diinkubasi Selama 36 Jam.



Keterangan :

- | | | |
|---------|---------|--|
| 1. N-A1 | 6. N-B3 | 11. N-C5 |
| 2. N-A2 | 7. N-B5 | 12. N-C7 |
| 3. N-A7 | 8. N-B6 | 13. N-C9 |
| 4. N-B1 | 9. N-C3 | 14. <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 |

Tabel 03. Hasil Pengujian Biokimia (Fisiologi) Isolat Genus Bacillus

Pengujian	Isolat Bakteri												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Tumbuh :													
pada suhu 37 C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pada suhu 50 C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pertumbuhan anaerob	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Katalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hidrolisis kasein	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hidrolisis amilum	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
Hidrolisis gelatin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pembentukan indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pembentukan H S	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
Fermentasi :													
Glukosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sukrosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Laktosa	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
Arabinosa	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Pembentukan asam :													
MR	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
VP	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+
Penggunaan sitrat	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+
Reduksi nitrat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Sumber : Data primer oleh Noorlanyati, 1994.

Keterangan :

- + : reaksi positif 4. N-B1 10.N-C4
 - : reaksi negatif 5. N-B2 11.N-C5
 * : dihasilkan gas 6. N-B3 12.N-C7
 1 : N-A1 7. N-B5 13.N-C9
 2. : N-A2 8. N-B6
 3. : N-A7 9. N-C3

Diskripsi morfologi dan karakterisasi fisiologi dari kelima isolat *Bacillus sp* yang mempunyai daya proteolitik terbesar adalah sebagai berikut :

1. Isolat N-A1

Batang bentuk batang, gram positif, tidak tahan asam (non acid fast), endospora berbentuk bulat telur (oval), letaknya ditengah sel (sentral), warna koloni kuning muda, pertumbuhan koloni pada permukaan agar tipis, bentuk tidak teratur, tepi koloni berombak, permukaan koloni ttransparan dan licin, pertumbuhan pada medium cair menyebar keseluruh medium (bersifat fakultatif anaerob), tidak dapat tumbuh dalam keadaan anaerob, mengadakan motilitas, bersifat katalase positif, mampu menghidrolisis kasein, mampu mencairkan gelatin, mampu memfermentasi karbohidrat (glukosa, laktosa, sukrosa, arabinosa), menunjukkan reaksi positif pada uji voges proskauer, reduksi nitrat dan mampu membentuk gas H_2S , menunjukkan hasil negatif pada uji merah metil, dan indol, todak mampu menghidrolisis amilum, tidak mampu menggunakan sitrat sebagai sumber karbon. Dengan melihat morfologi dan karakteristik biokimianya, isolat ini mempunyai kemiripan dengan *Bacillus polymyxa*.

2. Isolat N-A7

Bakteri bentuk batang, gram positif, tidak tahan asam (non acid fast), endospora berbentuk bulat, letaknya sentral didalam selnya, pertumbuhan koloni pada medium nutrien agar transparan, warna koloni kuning muda,

tepi koloni berombak halus, bentuk tidak teratur, permukaan koloni kelihatan seperti berair, bersifat katalase positif, mengadakan motilitas, pertumbuhan pada suhu mesofil, tidak mampu tumbuh pada suhu termofil, mampu menghidrolisis kasein, menghidrolisis pti dan mencairkan gelatin, beberapa karbohidrat difermentasi dengan menghasilkan asam yaitu pada fermentasi sukrosa, dan menghasilkan asam dan gas pada fermentasi glukosa, laktosa, arabinosa tidak mampu difermentasi menunjukkan feaksi positif pada uji vegas proskauer, merah metil, reduksi nitrat, dan mampu membentuk H₂S, tidak mampu membentuk indol dan menggunakan sitrat sebagai sumber karbon. Dengan melihat morfologi dan karakteristik biokimianya, isolat ini mempunyai kemiripan dengan *Bacillus pumilus*.

3. Isolat N-B6

Bakteri bentuk batang, gram positif, tidak tahan asam (non acid fast), endospora terletak ditengah selnya (sentral), berbentuk oval, pertumbuhan koloni pada medium nutrien agar berwarna kuning muda, bentuk koloni tidak teratur, tepi berombak, permukaan koloni mengkilat dan sedikit berair, pertumbuhan pada medium cair pada bagian atas dari medium (bersifat aerob), tidak dapat tumbuh dalam keadaan anaerob, bersifat katalase positif, motil, mampu menghidrolisis kasein, menghidrolisis peti, mencairkan gelatin, mampu memfermentasi glukosa dengan menghasilkan asam dan

gas, mampu memfermentasi sukrosa, sedang laktosa dan arabinosa tidak mampu difermentasi, mampu mereduksi nitrat, menggunakan sitrat sebagai sumber karbon dan membentuk H_2S , menunjukkan reaksi negatif pada uji merah metil, voges proskauer dan indol. Karakteristik morfologi koloni dan biokimia isolat ini mirip dengan karakteristik *Bacillus brevis*.

4. Isolat N-C3

Bakteri bentuk batang, motil, gram positif, bersifat tidak tahan asam (non acid fast), endospora berbentuk oval, letaknya hampir diujung sel (sub terminal), pertumbuhan pada medium nurrien agar berwarna kuning muda, bentuk tidak teratur, tepi koloni berombak halus, permukaan kasar (seperti ada titik-titik halus), pertumbuhan medium pada bagian atas dari medium (bersifat aerob), tidak mampu tumbuh pada keadaan anaerob, suhu pertumbuhan mesofil, tidak mampu tumbuh pada termofil, mampu menghidrolisis kasein, menghidrolisis pati, dan mencairkan gelatin, mampu memfermentasi glukosa, sukrosa, laktosa dan arabinosa, menunjukkan reaksi positif pada uji merah metil, voges proskauer, reduksi nitrat, mampu menggunakan sitrat sebagai sumber karbon, menghasilkan sedikit H_2 , tidak mampu membentuk indol. Karakteristik morfologi dan biokimia isolat ini mirip dengan *Bacillus lichen-formis*.

5. Isolat N-C9

Bakteri bentuk batang, motil, gram positif, tidak tahan asam(non acid fast), endospora terletak ditengah selnya (sentraol), berbentuk oval, pada medium nutrisi, agar koloni berwarna kuning muda, bentuk tidak teratur, tepi koloni berombak, permukaan koloni buram, menebal dan sedikit berair, pertumbuhan pada medium cair pada bagian atas dari medium (bersifat aerob), tidak mampu tumbuh dalam keadaan anaerob, pertumbuhan pada suhu mesofil, tidak mampu tumbuh dalam keadaan termofil, bersifat katalase positif dan motil, mampu menghidrolisis kasein, menghidrolisis amilum, mencairkan gelatin, memfermentasi glukosa dengan menghasilkan gas dan asam, memfermentasi sukrosa laktosa dan arabinosa dengan menghasilkan gas, menunjukkan reaksi positif pada uji merah metil, voges prokauer, reduksi nitrat, membentuk H₂S mampu menghasilkan sitrat sebagai sumber karbon, tidak mampu membentuk indol. Karakteristik morfologi koloni dan biokimia isolat ini mirip dengan *Bacillus subtilis*.