

ISOLASI MIKROBA TANAH YANG BERPOTENSI MENGHASILKAN ANTIMIKROBA

Submitted : 23 Oktober 2019

Edited : 15 Juni 2020

Accepted : 25 Juni 2020

Ririn Puspawati*, Rina Anugrah, Afif Abdulbasith, Intan Yunita

Fakultas Farmasi Universitas Jenderal Achmad Yani Cimahi

Email : ririn.puspawati@lecture.unjani.ac.id

ABSTRACT

The soil is one of the habitats for microorganisms, in one gram soil there are millions of microorganism. Population microorganism per gram the rich soil of covering bacteria, actinomycetes, fungi, algae and protozoa. Garden having the potential to do exploration of isolation microorganisms. This is because land contains many organic compounds and minerals that is one ecosystem fertile to life and growth microorganisms. Whenever a microorganisms have proven produce substance antimicrobe so organisms of its potential as producer antibiotics. Material research the land, taken from the soil Faculty of Pharmacy Plant Garden of UNJANI, we did dilution and cultivated in a media potato dextrose broth. The isolate from medium broth was cultivating in a media potato dextrose agar, to obtained isolates single. Isolates obtained seen features macroscopic and microscopic. The results obtained isolates isolation two of the four isolates that can give inhibition to Escherichia coli which diameter inhibition were $11,47 \pm 0,05$ mm and inhibition to Staphylococcus aureus which diameter inhibition were $23,83 \pm 0,46$ mm.

Keywords : soil, microbe, isolation, fermentation, diameter inhibition

PENDAHULUAN

Tanah yang terbentuk merupakan hasil kombinasi dari proses fisik, biologi maupun kimia. Pada tanah baik didalam maupun di permukaan terdapat mikroba yang berkembang biak secara beraneka ragam⁽¹⁾. Jenis mikroba tanah antara lain dapat berupa bakteri, aktomisetes dan fungi. Adanya mikroba dalam tanah dapat berperan sebagai penyubur tanah karena menghasilkan zat-zat nutrisi dalam tanah. Selain itu mikroba juga berperan untuk menguraikan bahan-bahan organik dan menghasilkan zat yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba sebagai hasil metabolismenya⁽²⁾.

Banyak jasad renik yang diisolasi dari tanah ditemukan memiliki kemampuan menghasilkan zat-zat

antibiotik⁽³⁾ Produksi antibiotika yang berasal dari hasil metabolisme mikroba dilakukan secara fermentasi. Proses fermentasi ini membutuhkan koloni mikroba sebagai stater dan media tertentu sebagai substrat (sumber nutrisi). Beberapa penelitian di Indonesia sudah membuktikan adanya mikroba tertentu yang menghasilkan metabolit yang berpotensi sebagai antimikroba⁽⁴⁾.

Mikroorganisme yang berada di permukaan maupun dalam tanah dapat dijadikan sebagai koleksi untuk koservasi mikroba tanah. Salah satu tempat yang menjadi habitat dari mikroba adalah kebun. Tanah kebun sangat berpotensi untuk diambil dan digunakan sebagai bahan untuk mencari mikroba yang bermanfaat⁽⁵⁾.

METODE PENELITIAN

Isolasi mikroba

Sebanyak 10 gram sampel tanah diambil dari Kebun Tanaman Obat UNJANI. Masing-masing 5 gram tanah direndam dalam 50 mL NB dan 5 gram lainnya direndam dalam media PDB, kemudian dihomogenkan dan diinkubasi (24 jam, 37°C) untuk tanah dalam media NB dan 3 hari pada suhu 25°C untuk tanah dalam media PDB. Mikroba yang tumbuh pada media NB dan PDB dilakukan pemisahan dengan kultur berulang pada NA, diinkubasi (37°C; 24 jam). Pada media PDA inkubasi dilakukan selama 3 hari pada suhu 25°C. Proses dilakukan berulang sampai diperoleh isolat tunggal⁽⁶⁾.

Identifikasi mikroba secara fenotip

Pemeriksaan fenotip meliputi pengamatan makroskopis dan mikroskopis (pergerakan bakteri, pewarnaan Gram, uji TSIA, dan uji IMVIC) yang selanjutnya data hasil pengujian dicocokkan menggunakan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 7th edition*⁽⁷⁾.

Pengamatan Makroskopis

Pengamatan makroskopis dilakukan dengan mengamati secara visual koloni bakteri dan khamir pada media meliputi warna, bentuk, serta permukaan koloni⁽⁸⁾.

Pengamatan Mikroskopik

Pengamatan mikroskopis meliputi pergerakan bakteri, pewarnaan Gram bakteri, identifikasi bakteri dengan media TSIA, uji IMVIC (Indole, Metil Merah, Voges Proskauer, Simmon sitrat) dan identifikasi kapang dengan uji Moist Chamber⁽⁷⁾.

Fermentasi

Isolat mikroba difermentasi dalam 50 mL NB dan PDB. Isolat mikroba dalam NB diinkubasi (24, 48, dan 72 jam; 37°C) dalam

shaker inkubator dengan kecepatan 150 rpm. Isolat mikroba dalam PDB diinkubasi pada suhu 25°C selama 3 hari, 5 hari dan 7 hari dalam *shaker* inkubator dengan kecepatan 150 rpm.

Hasil fermentasi disentrifugasi ulang (4000 rpm, 30 menit) untuk memperoleh supernatan sebagai metabolit dari bakteri yang akan diuji aktivitas antimikrobanya⁽⁴⁾.

Pengujian Aktivitas Antimikroba.

Aktivitas antimikroba diuji menggunakan metode difusi perforasi dengan cara suspensi mikroba uji *Escherichia coli* sebanyak 1 mL dimasukkan kedalam cawan Petri steril kemudian tambahkan 20 mL media NA yang masih cair kemudian dibiarkan memadat dan dibuat lubang-lubang dengan menggunakan perforator. Perlakuan yang sama juga dilakukan pada pengujian untuk *Staphylococcus aureus*, yaitu 1 mL suspensi mikroba uji *Staphylococcus aur* dimasukkan ke dalam cawan Petri steril ditambahkan 20 mL media NA yang masih cair kemudian dibiarkan memadat dan dibuat lubang-lubang dengan menggunakan perforator. Untuk *Candida albicans* sebanyak 1 mL suspensi mikroba uji ditambahkan 20 mL media PDA yang masih cair dan diberi lubang setelah memadat. Masing-masing lubang tersebut diisi dengan sampel uji (supernatan hasil fermentasi) sebanyak 50 µL. Cawan diinkubasi (24 jam, 37°C) untuk media NA dan (72 jam, 25°C) untuk media PDA⁽⁹⁾.

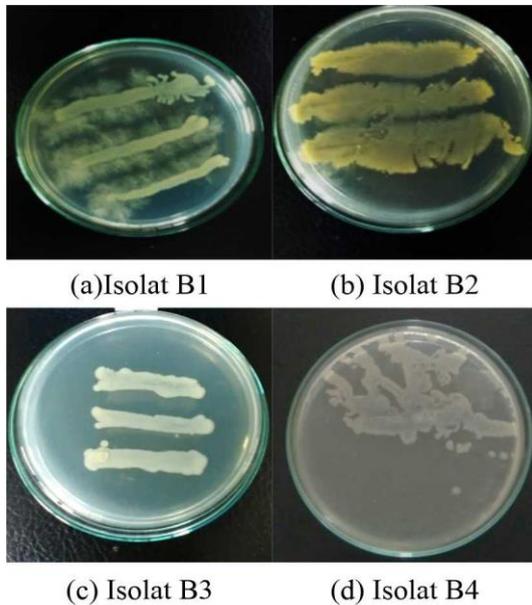
Parameter terjadinya daya hambat dilakukan terhadap dengan melihat adanya dengan daerah bening yang muncul di sekitar lubang. Diameter hambat pertumbuhan mikroba diukur menggunakan jangka sorong.

HASIL DAN PEMBAHASAN

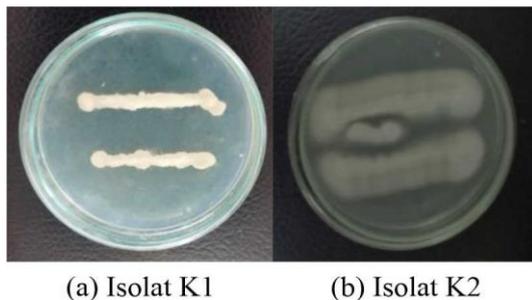
Isolasi Mikroba Tanah

Isolasi dilakukan dengan mengambil koloni secara aseptik dan digoreskan ke media NA yang telah padat, kemudian diinkubasi (24 jam, 37°C). Setiap koloni di inokulasikan kembali secara berulang-ulang sampai didapatkan kultur murni⁽¹⁰⁾.

Dari hasil penelitian diperoleh 4 isolat bakteri tumbuh di media NA pada suhu inkubasi 37°C lama inkubasi ialah 24 jam dan 2 isolat kapang/khamir yang tumbuh di media PDA pada suhu inkubasi 25°C. Berikut ialah isolat bakteri, kapang dan khamir yang diperoleh dari penelitian ini.



Gambar 1. Isolat bakteri hasil isolasi dari tanah



Gambar 2. Isolat kapang/khamir dari tanah

Setelah mendapatkan isolat bakteri, selanjutnya dilakukan identifikasi bakteri dari isolat yang diperoleh tersebut. Identifikasi dilakukan secara makroskopis. Untuk melihat morfologi bakteri dilakukan dengan mengamati cara mengamati

berdasarkan visual koloni bakteri pada media pertumbuhan meliputi warna, bentuk serta permukaan koloni⁽⁹⁾.

Secara makroskopis isolat B1 koloninya timbul, berwarna putih kekuningan, tepi halus, sedangkan isolat B2 memiliki ciri makroskopis koloni yang berwarna kuning, koloninya timbul, tepi halus. Isolat B3 memiliki ciri makroskopis koloni berwarna putih, licin, mengkilap, berada di atas media. Isolat B4 memiliki ciri makroskopis koloni berwarna abu-abu, berada di atas media. Pengamatan morfologi pada keempat koloni isolat B1, B2, B3 dan B4 tersebut tumbuh di permukaan Koloni yang timbul di atas media menandakan bahwa isolat bersifat aerob⁽¹¹⁾.

Selain identifikasi secara makroskopis dilakukan pula identifikasi secara mikroskopis, uji biokimia IMVIC dan uji TSIA. Berikut merupakan tabel hasil identifikasi bakteri dari isolat yang diperoleh.

Berdasarkan makroskopis dan uji identifikasi secara fenotip, dan membandingkan dengan berbagai pustaka, isolat bakteri berwarna putih (B1) memiliki kesamaan ciri makroskopis dan mikroskopis dengan genus *Acinetobacter sp.* dengan ciri koloninya yang timbul, berwarna putih, tepi halus. Secara makroskopis bakteri berbentuk bulat, termasuk bakteri Gram negatif dan bakteri aerob, mampu tumbuh dengan memfermentasikan glukosa (uji TSIA positif menghasilkan gas H₂S), uji indol, metil merah, voges proskauer (deteksi adanya asetoin) negatif, memanfaatkan sitrat sebagai sumber karbon (uji sitrat positif) dan memiliki kemampuan menghasilkan enzim katalase (uji katalase positif). Bakteri *Acinetobacter sp.* Secara alami berada di tanah, air dan kotoran⁽¹²⁾.

Tabel 1. Hasil identifikasi bakteri

Pengujian	Isolat Bakteri			
	B1	B2	B3	B4
Pewarnaan Gram	(-)	(-)	(-)	(+)
Indol	(-)	(-)	(-)	(-)
Motilitas	(-)	(-)	(+)	(-)
Metil Merah	(-)	(-)	(-)	(+)
Simon Sitrat	(+)	(-)	(+)	(+)
TSIA	(+)	(-)	(+)	(+)
Gas H ₂ S	(+)	(-)	(-)	(-)
Kesimpulan	<i>Acinetobacter sp.</i>	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	<i>Corynebacterium sp.</i>	<i>Bacillus sp.</i>

Isolat bakteri berwarna kuning (B2) memiliki kesamaan ciri makroskopis dan mikroskopis dengan genus *Pseudoalteromonas sp.* dengan ciri makroskopis koloni berwarna kuning kasar, bentuk bundar, dan tepi halus. Secara mikroskopis bakteri berbentuk batang, (bakteri Gram negatif) dan bakteri aerob, tidak memfermentasikan glukosa (uji TSIA negatif tidak menghasilkan gas H₂S), uji indol, metil merah, voges proskauer (deteksi adanya asetoin) negatif, sitrat negatif dan memiliki kemampuan menghasilkan enzim katalase (uji katalase positif). Bakteri *Pseudoalteromonas sp.* banyak ditemukan berasosiasi dengan “host eukariotik” yang sering diisolasi dari alam⁽¹³⁾.

Hasil uji aktivitas biokimia isolat B3 seperti yang tertera pada Tabel 3 menunjukkan terjadinya fermentasi glukosa pada uji TSIA. Jika berdasarkan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 7th edition*, isolat B3 termasuk ke dalam genus *Corynebacterium sp.* Genus *Corynebacterium* juga sebagai bakteri tanah⁽¹⁴⁾.

Hasil pengamatan isolat B4 pada secara makroskopis terlihat koloni berbentuk bulat, berwarna abu-abu kusam.

Secara mikroskopis bentuk sel *basil* (batang), bersifat Gram positif. Berdasarkan pengujian secara biokimia pada Tabel 3 berdasarkan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 7th edition* merupakan genus *Bacillus sp.* dengan ciri-ciri berbentuk batang, terdapat di tanah di air tawar maupun air laut⁽¹⁴⁾.

Isolat khamir (K1) memiliki kesamaan ciri makroskopis dan mikroskopis dengan genus *Saccharomyces sp.*, yaitu koloninya berwarna putih kekuningan, tepian halus, permukaan licin, berlendir dan hasil pengamatan dari uji *moist chamber* nampak selnya berbentuk sirkuler, tepian rata, elevasi cembung, Penelitian terdahulu pun berhasil mengisolasi khamir dengan genus *Saccharomyces sp.* dari alam⁽⁷⁾.

Isolat kapang (K2) memiliki berdasarkan uji *moist chamber* mempunyai ciri yang sama secara makroskopis dan mikroskopis dengan genus *Aspergillus sp.* Isolat K2 berwarna abu-abu, tepian seperti memiliki rambut-rambut halus.

Fermentasi

Fermentasi dilakukan terhadap semua isolat mikroba yang diperoleh dari proses isolasi, untuk diambil metabolit sekundernya

yang akan digunakan untuk pengujian aktivitas antimikroba. Lama proses fermentasi untuk isolat bakteri yaitu 24 jam, 48 jam dan 72 jam. Sedangkan lama proses fermentasi untuk isolat kapang/khamir yaitu 3 hari, 5 hari dan 7 hari. Hasil fermentasi dari isolat bakteri dan isolat kapang/khamir disentrifugasi untuk kemudian diambil metabolitnya.

Isolat-isolat yang telah difermentasi disentrifugasi untuk mengambil supernatan yang terdapat metabolit sekunder didalamnya, keberadaan metabolit sekunder dalam supernatan untuk uji aktivitas antimikroba, didukung oleh beberapa penelitian yang menggunakan supernatan untuk uji aktivitas antimikroba⁽¹⁵⁾.

Pengujian aktivitas antimikroba

Aktivitas antimikroba diketahui dengan melakukan uji terhadap metabolit dari isolat bakteri dilakukan dengan metode

difusi perforasi terhadap mikroba uji *Candida albicans*, *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Hasil pengujian diperoleh metabolit dari isolat yang berpotensi mempunyai aktivitas sebagai antimikroba ialah isolat B1 dan K1. Supernatan hasil fermentasi isolat B1 memberikan diameter hambat pada *Candida albicans*, *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Diameter hambat menunjukkan kekuatan daya antimikroba yang digolongkan berdasarkan penggolongan Davis dan Stout: daya antibakteri sangat kuat jika diameter hambat lebih dari 20 mm, kuat jika diameter hambat 10-20 mm, sedang jika diameter hambat 5-10 mm, dan lemah jika diameter hambat kurang dari 5 mm⁽¹⁶⁾.

Berikut merupakan tabel pengukuran zona bening hasil pengujian aktivitas antimikroba.

Tabel 2. Hasil uji aktivitas antimikroba dari isolat bakteri

No.	Isolat Mikroba	Lama Fermentasi	Diameter Hambat pada Mikroba Uji (mm)		
			<i>Candida albicans</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
1	Bakteri berwarna putih	24 jam	14,70±1,65	-	18,96±0,66
2	kekuningan (B1)	48 jam	14,50±0,10	12,67±0,30	-
3		72 jam	15,20±1,60	-	-
4	Bakteri berwarna kuning (B2)	24 jam	-	-	-
5		48 jam	-	-	-
6		72 jam	-	-	-
7	Bakteri berwarna putih (B3)	24 jam	-	-	-
8		48 jam	-	-	-
9		72 jam	-	-	-
10	Bakteri berwarna abu-abu (B4)	24 jam	-	-	-
11		48 jam	-	-	-
12		72 jam	-	-	-

Supernatan dilakukan pengujian bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* memiliki diameter hambat yang berbeda, Berdasarkan hasil pengukuran terhadap diameter hambatan pada *Staphylococcus aureus* menghasilkan diameter hambat sebesar $18,96 \pm 0,66$. *Staphylococcus aureus* termasuk Gram + dengan dinding sel yang terdiri dari peptidoglikan dan asam teikoat sehingga metabolit dapat masuk kedalam sel dengan mudah Pada *Escherichia coli* mempunyai dinding sel yang terdiri dari peptidoglikan lipoprotein, lipopolisakarida dan selaput luar yang membuat metabolit susah menembus sel sehingga menghasilkan diameter hambat yang lebih kecil dibanding *Escherichia coli*⁽¹⁰⁾.

Bakteri Gram – memiliki susunan dinding sel yang tersusun lebih kompleks sehingga antibakteri susah untuk masuk kedalam sel. Jika diujikan *Escherichia coli* dengan isolat B1 yang lama fermentasinya 48 jam, mampu memberikan daya hambat dibandingkan dengan lama fermentasi 24 dan 72 jam, diduga 48 jam merupakan fase log, dimana perbanyak jumlah sel meningkat. Menurut Surono (2004) dalam Uun (2008) s lama waktu fermentasi, akan membuat bakteri semakin aktif dengan jumlah yang semakin banyak, untuk memecah substrat dan menghasilkan metabolit yang berpotensi

sebagai antimikroba. Untuk fermentasi bakteri selama 72 jam sudah memasuki fase kematian sehingga metabolit sekundernya tidak diproduksi lagi. Sedangkan jika diujikan dengan *Staphylococcus aureus*, isolat dengan lama fermentasi 24 jam lah yang berpotensi sebagai antibiotik. Beberapa penelitian sebelumnya pun mendukung bahwa 24 jam merupakan fase log menuju fase stasioner dari bakteri dalam perkembangbiakkannya⁽¹⁴⁾.

Supernatan semua durasi fermentasi yang diujikan pada khamir *Candida albicans* menunjukkan adanya diameter hambat pada setiap durasi fermentasi. Hal tersebut menunjukkan bahwa metabolit sekunder dari isolat B1 secara kontinyu diproduksi saat fermentasi dan berpotensi sebagai antimikroba.

Begitu pula pada uji aktivitas menggunakan supernatan isolat khamir K1. Hasil pengujian menunjukkan bahwa metabolit dari isolat khamir K1 memiliki aktivitas antimikroba sedangkan isolat kapang K2 tidak memiliki aktivitas sebagai antimikroba. Supernatan hasil fermentasi isolat K1 memberikan daya hambat pada *Candida albicans*, *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dengan daya hambat yang berbeda. Berikut merupakan tabel pengukuran zona bening hasil pengujian aktivitas antimikroba.

Tabel 3. Hasil uji aktivitas antimikroba dari isolat kapang, khamir

No.	Isolat Mikroba	Lama Fermentasi	Diameter Hambat pada Mikroba Uji (mm)		
			<i>Candida albicans</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
1	Khamir	3 hari	$16,03 \pm 0,63$	$11,47 \pm 0,05$	$23,83 \pm 0,46$
2	berwarna putih	5 hari	$18,30 \pm 0,95$	-	$22,23 \pm 0,15$
3	kekuningan (K1)	7 hari	$10,33 \pm 0,25$	-	-
4	Kapang	3 hari	-	-	-
5	berwarna	5 hari	-	-	-
6	abu-abu (K2)	7 hari	-	-	-

Perbedaan diameter hambat dari ketiga mikroba uji, menunjukkan bahwa setiap mikroba uji memiliki kemampuan proteksi dan kelemahan dari masing-masing sel mikroba. Pada isolat khamir K1 menunjukkan bahwa fermentasi selama 3 hari berpotensi sebagai antimikroba terhadap semua mikroba uji, fermentasi selama 5 dan 7 hari sudah tidak mampu menghambat *Escherichia coli*. Jika diujikan dengan *Staphylococcus aureus* fermentasi 3-5 hari masih mampu memberikan daya hambat. Jika diujikan dengan *Candida albicans* memiliki daya hambat yang baik dari semua supernatan hasil fermentasi. Waktu fermentasi mempengaruhi aktivitas antibakteri dan mutu kimia (total asam dan pH)⁽¹⁵⁾.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil isolasi mikroba dari tanah di kebun tanaman obat diperoleh 6 isolat bakteri dan 4 isolat kapang/khamir. Uji identifikasi, keempat isolat bakteri tersebut memiliki kesamaan ciri dengan genus *Acinetobacter sp.*, *Pseudoalteromonas sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Bacillus sp.* dan kedua isolat kapang/khamir memiliki kesamaan ciri dengan genus *Saccharomyces sp.* dan *Aspergillus sp.* Isolat *Acinetobacter sp.* yang diambil metabolit sekundernya pada jam ke-24 mampu menghambat pertumbuhan *Candida albicans* dan *Staphylococcus aureus* dengan kategori daya hambat kuat dimana diameter hambat masing-masing sebesar 14,70±1,65 mm dan 18,96±0,66 mm. Metabolit sekundernya yang diambil pada jam ke-24 mampu menghambat pertumbuhan *Candida albicans* sebesar 14,50±0,10 dan *Escherichia coli* sebesar 12,67±0,30 mm. Dari kedua isolat kapang/khamir yang diambil metabolit sekundernya pada hari ke-3, hanya *Saccharomyces sp.* mampu menghambat *Candida albicans*, *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dengan kategori daya

hambat kuat dimana diameter hambat masing-masing sebesar 16,03±0,63 mm, 11,47±0,05 mm dan 23,83±0,46 mm.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada LPPM UNJANI dengan no : SKEP/133/UNJANI/VII/2017 yang telah memberikan dana untuk penelitian ini

DAFTAR PUSTAKA

1. Panangan, Almundari T. (2011): "Isolasi Mikroba Penghasil Antibiotika Dari Tanah Kampus Unsri Indralaya Menggunakan Media Ekstrak Tanah." *Jurnal Penelitian Sains* 14(C): 37–40.
2. Nurkanto, Arif. (2007): "Identifikasi Aktinomisetes Tanah Hutan Pasca Kebakaran Bukit Bangkirai Kalimantan Timur Dan Potensinya Sebagai Pendegradasi Selulosa Dan Pelarut Fosfat." 8: 314–19.
3. Adriani, and Yessica Febriwanti Tulak. (2013): "Isolasi dan Karakterisasi Actinomycetes sebagai Penghasil Antibiotik dari Sampel Tanah Pada Peternakan Sapi di Kecamatan Galesong Kabupaten Takalar." *Biogenesis* 1(2): 97–100.
4. Naid, Tadjuddin, Syaharuddin Kasim, Asnah Marzuki, and Sumarheni. (2013): "Produksi Antibiotika Secara Fermentasi Dari Biakan Mikroorganisme Symbion Rumput Laut Euche." 8: 314–19.
5. Kanti, A. (2005): Laporan Penelitian Bidang Zoologi Keragaman Khamir Tanah Asal Taman Nasional Kalimutu Dan Taman Wisata Alam Ruteng Nusa Tenggara Timur. Bogor.
6. Naiola, Elidar, and Nunuk Widhyastuti. (2002): "Isolasi, Seleksi Dan Optimasi Produksi Protease Dari Beberapa Isolat Bakteri." *Berita Biologi* 6(3): 467–73.
7. Yusra, Fauzan Azima, Novelina, and Periadnadi. (2014): "Isolasi Dan

- Identifikasi Mikroflora.” *Agritech* 34(3): 316–21.
8. Suryani, Yani, Poniah Andayaningsih, and Iman Hernaman. (2012): “Isolasi dan Identifikasi Jamur Selulolitik pada Limbah Produksi Bioetanol dari Singkong Yang Berpotensi dalam Pengolahan Limbah menjadi Pakan Domba.” VI(1): 1–10.
 9. Balouiri, Mounyr, Moulay Sadiki, and Saad Koraichi Ibsouda. (2016): “Methods for In Vitro Evaluating Antimicrobial Activity.” *Journal of Pharmaceutical Analysis*: 71–79.
 10. Jawetz, E.Melnick, and E.A Adelberg. (1986): *Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan*. 16th ed. ed. Bonang Gerard. Jakarta: CV. EGV, Penerbit Buku Kedokteran.
 11. Bahi, Muhammad. (2016): “Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Metabolit Sekunder Dari Bakteri Laut *Streptomyces* Sp.” 1(3): 161–64.
 12. Holt, John (1994): *Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology*. United States of America: Sanstache.
 13. Baehaki, A, Rinto, and A Budiman. (2011): “Isolasi dan Karakterisasi Protease dari Bakteri Tanah Rawa Indralaya, Sumatera Selatan.” *J. Teknol. dan Industri Pangan* XXII(1): 37–42.
 14. Soliev, Azamjon B, Kakushi Hosokawa, and Keiichi Enomoto. (2011): “Bioactive Pigments from Marine Bacteria: Applications and Physiological Roles.” 2011.
 15. Kunaepah, Uun. (2008): “Pengaruh Lama Fermentasi dan Konsentrasi Glukosa Terhadap Aktivitas Antibakteri, Polifenol Total Dan Mutu Kimia Kefir Susu Kacang Merah.” Universitas Diponegoro.
 16. Davis, W.W, and T.R. Stout. (1971): *Disc Plate Methods of Microbiological Antibiotic Assay*. 22nd ed. J. Microbiology.