

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Juli – November 2009. Pengambilan sampel udang windu (*Penaeus monodon*) diperoleh dari tambak udang BBPBAP (Balai Besar Pengembangan Buddidaya Air Payau) Jepara. Isolasi bakteri dan amplifikasi PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dilakukan di Laboratorium Kesehatan Ikan dan Lingkungan BBPBAP Jepara. Selanjutnya, sekuensing DNA dilakukan di Charoen Pokphand Indonesia, Ancol Barat Propinsi DKI Jakarta.

3.2. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah udang windu (*Penaeus monodon*), media agar non selektif NA (*Nutrient Agar*). Untuk uji biokimia meliputi *Nutrient Broth* (NB), KNO_3 , sulfanilic acid, sodium citrate, bromothymol blue, dipotassium phosphate, simmon's citrate agar, pepton, lactose, sucrose, glucose, cellobiose, mannose, raffinose, salicin, xylose, base urea, KCl, MgSO_4 , NaCl, larutan kristal violet, safranin, iodine, immersion oil, hidrogen peroksida 3% (H_2O_2), tetramethyl-phenylendiamine 1 %, alkohol, aquades, spritus, naptol, 40% KOH, creatin, nitrat broth, trisalt (Larutan Tiga Garam), MR-VP broth, reagent metil red, covac, kultur bakteri, agarosa, buffer TBE 0,5x, loading dye 6x, SYBR safe, marker DNA 1 kb DNA Ladder (*Fermentas*; #SM0311/2/3), etil – alkohol 95%, Taq DNA polymerase, PCR buffer 10x, dNTPs mix, primer 1540R (5'AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') 24F (5'AGAGTTTGATCCTGGCT- 3') MgCl_2 25 mM.

Adapun alat – alat yang digunakan untuk membuat isolat bakteri ini adalah inkubator, autoclave, Erlenmeyer, pemanas, alumunium foil, gunting bedah, plastik, vortek mixer, batang L, slides, cawan petri, neraca ohaus dengan ketelitian 0,1 g, gelas ukur, tabung reaksi, kapas, glass spreader, jarum ose, tabung eppendorf 1,5 ml tabung eppendorf 2,0 ml, lampu busen, freezer, waterbath, mikropipet, mikroskop dan kamera digital. Sedangkan Peralatan yang digunakan untuk skrining bakteri adalah: homogenizer *Tomy MS-100R*, mesin sentrifuse *Tomy/MX-*

301, UV-Visible spectrophotometer, microwave, vortex mixer, Mikropipet Gilson 2-20 μl (seri 05043C) 50-200 μl (seri 05044C) buatan Perancis, PCR thermal cycler (Takara Thermal Cycler Dice-model TP 600 v 2.00), UV Trans illuminator unit, Electrophoresis BioRad, Digibox camera, dan AB 3130 Genetic Analyzer.

3.3. Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah eksperimen, untuk mengetahui jenis bakteri probiotiknya dengan melakukan isolasi dan identifikasi morfologi dan kimia bakteri probiotik dari udang windu (*Penaeus monodon*) di Laboratorium Kesehatan Ikan dan Lingkungan BBPBAP Jepara. Amplifikasi sekuensing 16S rDNA, dan analisis bioinformatika untuk mengetahui karakteristik molekuler spesies bakteri probiotik dilakukan di Charoen Pokphand Indonesia, Ancol Barat Propinsi DKI Jakarta..

3.4. Prosedur Penelitian

3.4.1. Pengambilan Sampel dan Isolasi Bakteri

Sampel udang dicuci, dikeringkan dan dibedah secara aseptis kemudian digerus pada bagian saluran pencernaan lalu ditimbang. Hasil gerusan diencerkan dalam larutan trisalt (larutan fisiologis) pada pH 2 dengan tujuan hanya bakteri probiotik yang dapat tumbuh dan berkembang pada pH tersebut. Pengenceran dilakukan dengan menambahkan 9 ml larutan fisiologis berat udang digerus untuk mendapatkan pengenceran 10^{-1} . Dari pengenceran 10^{-1} diambil sebanyak 1 ml dan dipindahkan ke dalam tabung reaksi yang telah diisi dengan larutan fisiologis pH 2 sebanyak 9 ml. Hal ini dilakukan sampai taraf pada pengenceran yang diinginkan. Selanjutnya, dari masing – masing pengenceran diambil sebanyak 0,1 ml untuk dilakukan penanaman bakteri pada media NA. Koloni yang tumbuh direinokulasi pada media baru. Setiap koloni yang diperoleh dibuat tiga ulangan. Akhirnya dari beberapa kali pengulangan, ditemukan isolat murni dari bakteri heterotrof yang potensi sebagai probiotik. Penyimpanan koloni dilakukan pada suhu 25°C dan siap untuk digunakan pada pengujian selanjutnya. Selama penyiapan cawan petri dibungkus dengan plastik agar tidak terkontaminasi.



3.4.2. Identifikasi Bakteri

Pengamatan yang dilakukan secara langsung diidentifikasi (secara morfologi) seperti pengamatan bentuk sel, warna koloni, ukuran koloni dan tipe koloni. Selain itu, uji coba biokimia juga dilakukan terhadap uji bakteri. Uji morfologi maupun uji biokimia berdasarkan Cowan and Steel's (1992)

3.4.2.1. Pewarnaan Gram

Koloni yang tumbuh pada media agar NA dioleskan pada kaca preparat dan dikeringkan. Selanjutnya preparat disiram larutan *crystal violet*, didiamkan selama 1 menit, dan disiram dengan air. Kemudian preparat disiram dengan larutan iodin, didiamkan selama \pm 1 menit, dibilas dengan air. Etil-alkohol 95% diteteskan pada preparat dan digoyang-goyang selama 15 detik, lalu dicuci dengan air. Kemudian disiram dengan larutan *safranin*, dibiarkan selama 30 detik lalu dicuci dengan air dan dikeringkan dengan kertas saring, setelah kering preparat ditetesi dengan imersi oil untuk memperjelas pengamatan. Selanjutnya diamati dibawah mikroskop. Bakteri gram positif berwarna ungu atau violet, sedangkan bakteri gram negatif berwarna merah jambu atau kemerahan.

3.4.2.2. Uji Motility

Bakteri diambil dari biakan agar miring umur 24 jam menggunakan ose lurus. Ose kemudian ditusukan pada medium motility (SIM) bersifat setengah padat. Medium diinokulasikan selama 24 jam atau lebih. Jika pertumbuhan koloni bakteri tampak menyebar ke samping di luar tusukan maka bakteri bersifat motil, sedangkan apabila pertumbuhan koloni bakteri hanya terdapat pada daerah tusukan maka bakteri bersifat non motil

4.2.2.3. Uji Aerobiosis

Bakteri diinokulasi pada medium yang sesuai dalam dua petridisk. Salah satu petridisk dimasukkan dalam anaerobic jar. Pada anaerobik jar tersebut juga dimasukkan O_2 absorbant yang ditetesi aquades sebanyak 5 – 10 tetes dan indikator kondisi anaerobik. Kultur bakteri pada petridisk yang lain diinkubasi di luar anaerobik jar. Pengamatan dilakukan setelah inkubasi 24 – 28 jam dengan membandingkan pertumbuhan bakteri pada ke dua petridisk. Jika bakteri hanya tumbuh pada petridisk diluar anaerobik jar maka bakteri bersifat aerob, sebaliknya



jika bakteri hanya tumbuh pada petridisk yang berada di dalam anaerobik jar maka bakteri bersifat anaerob. Jika bakteri tumbuh pada kedua petridisk maka bakteri bersifat fakultatif anaerob

3.4.2.4. Uji Katalase

Penentuan adanya katalase diuji dengan satu tetes larutan 3% H₂O₂ (Hidrogen peroksida) ditambahkan pada suhu koloni yang terpisah. Adanya produksi katalase, dilihat dari gelembung - gelembung gas yang diproduksi oleh koloni tersebut.

3.4.2.5. Uji Oksidase

Kultur bakteri diinokulasikan pada kertas saring yang telah ditetesi reagen oksidase (tetrametyl-phenylendiamine) . Reagen oksidase diteteskan pada bakteri sebanyak 1-2 tetes pengamatan dilakukan sekitar 10 -15 detik jika muncul warna ungu/ biru di atas basahan reagen maka bakteri menghasilkan enzim oksidase, sebaliknya jika tidak terjadi perubahan warna maka bakteri tidak menghasilkan enzim oksidase.

4.2.2.6. Uji Glukosa Acid

Kultur bakteri diinokulasikan kedalam tabung reaksi yang berisi media cair glukosa acid. Kemudian dinkubasi selama 3 hari, jika tidak terjadi perubahan warna maka glukosa bersifat positif, jika terjadi perubahan warna menjadi kuning berarti bersifat negatif.

4.2.2.7. Uji Pertumbuhan pada konsentrasi NaCl (10%,6%)

Bakteri inokulasikan pada media NaCl (10%,6%) kemudian diinkubasi 24 jam atau lebih. Pengamatan dilakukan dengan cara membandingkan kekeruhan bakteri setelah inkubasi dengan sebelum inkubasi. Apabila setelah dilakukan inkubasi tampak menjadi lebih keruh maka bakteri mampu tumbuh pada konsentrasi NaCl tersebut.

3.4.2.8. Uji Reduksi Nitrat

Inokulasikan biakan bakteri pada medium nitrat. Inkubasi selama 24 jam, tambahkan 5 tetes sulphanilik acid dan 5 tetes naphthylamine. Reaksi positif jika



terbentuk warna merah setelah 1 – 2 menit penambahan reagent, jika tidak, tambahkan sedikit serbuk zink. Terbentuknya warna merah menentukan bahwa reaksi adalah negatif (berarti nitrat tidak tereduksi)

3.4.2.9. Uji Indol

Bakteri diambil dari biakan agar miring umur 24 jam dengan ose lurus, kemudian diinokulasikan pada medium SIM. Setelah diinkubasi, reagen Erlich diteteskan kedalam medium SIM sebanyak 1-3 tetes. Jika terbentuk cincin merah maka bakteri mampu membentuk indol dari molekul tryptofan, sedangkan apabila tidak terbentuk cincin merah maka bakteri tidak dapat membentuk indol.

4.2.2.10. Uji ONPG

Kultur bakteri diinokulasikan kedalam tabung reaksi yang berisi media cair ONPG. Kemudian dinkubasi selama 24 jam, jika terjadi perubahan warna maka ONPG bersifat positif, begitu juga sebaliknya.

3.4.2.11. Uji Metil Red, Vages Prokauer (MR-VP test)

Koloni diinokulasi ke dalam 2 tabung reaksi yang berisi 1,5% MR-VP Media. Kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam-28 jam, tabung kontrol tanpa inokulasi disertakan pula. Selanjutnya ditambahkan lima tetes indikator merah metil pada tabung inokulasi MR-VP media. Kriteria positif apabila media berwarna merah dan tes negatif apabila media berwarna kuning. Satu tabung tersisa ditetesi dengan reagen barit's, jika berwarna pink berarti VP positif, dimana bakteri tersebut mampu memproduksi produk yang bersifat tidak asam atau netral dari asam organik yang dihasilkan dari metabolisme glukosa.

3.4.2.12. Uji Fermentasi Gula – Gula (Glukosa, Celebiose, Galaktosa, Rafinose, Salicin, Xylose).

Bakteri dinokulasikan pada 7 medium gula berbeda yang dilengkapi dengan tabung duham sebagai kontrol, bakteri juga dinokulasikan pada medium yang serupa tetapi tanpa gula, kemudian dinkubasi selama 7 – 14 hari. Bakteri dikatakan mampu memfermentasi gula apabila terjadi perubahan warna medium dari hijau menjadi kuning. Apabila warna medium tetap hijau atau berubah menjadi selain warna kuning maka bakteri dikatakan tidak mampu



mempermentasikan gula. Jika pada tabung durham terlihat gelembung udara berarti bakteri tersebut menghasilkan gas.

3.4.2.14. Uji Hidrolisis Stuarck

Nutrient Agar yang telah ditambahkan kandungan 0,2 % pati. Inokulasikan biakan bakteri pada medium. Inkubasi selama 24 jam, kemudian tambahkan beberapa tetes reagent gram iodin pada koloni bakteri yang tumbuh, hasil positif jika terbentuk warna biru pada daerah sekitar pertumbuhan bakteri. Hasil negatif, jika warna biru baik di pusat pertumbuhan maupun sekelilingnya.

3.4.2.14. Uji Hidrolisis Urea

Inokulasikan kultur bakteri ke dalam media agar yang telah dicampurkan base urea secara spot inokulating. Inkubasi selama 24 – 28 jam sampai terlihat pertumbuhan yang nyata. Uji positif jika terjadi perubahan dari hijau menjadi pink. Uji negatif jika tidak terjadi perubahan atau warna selain pink.

4.2.2.15. Uji Hidrolisis Casein

Siapkan media yang telah mengandung chitin 0,5 gr, agar 0,75 gr, NaCl 0,75 gr, yang dicampur kedalam akuades sebanyak 50 ml. Inokulasikan kultur bakteri dengan menggunakan ose steril secara ketukan. Inkubasi selama 2 -4 hari, setelah itu amati jika terbentuk daerah yang jernih disekitar pertumbuhan bakteri menandakan bahwa terjadi aktifitas dekomposisi chaitin oleh bakteri.

3.4.2.16. Uji Pertumbuhan pada Suhu 50⁰ C dan 37⁰ C

Bakteri dinokulasikan kedalam media agar NA (nutrient agar) dengan cara goresan. Kemudian inkubasi selama 24 jam dengan suhu 50⁰ C dan 37⁰ C. apabila pertumbuhan bakteri maksimal pada masing – masing media dengan perbedaan suhu, maka bakteri mampu beradaptasi dengan perubahan suhu.

3.4.2.17. Uji Citrat

Bakteri diambil dari biakan miring umur 24 jam dengan ose bulat. Bakteri diinokulasikan pada medium citrat. Bakteri diinkubasi selama 24 jam. Apabila medium berubah menjadi biru maka bakteri mampu memanfaatkan citrat sebagai sumber karbon untuk proses metabolisme dengan menghasilkan kondisi yang



alkali, sebaliknya apabila medium tetap hijau maka bakteri tidak mampu memanfaatkan citrat.

3.4.2.18. Uji Sensitifitas 0/129 disk

Uji sensitifitas antibiotik dengan menggunakan senyawa 2,4 diamino – 6,7 diisopropyl pteridine(0/129) yang berbentuk kertas kecil dengan kosentrasi 10 gr dan 150 gr yang kemudian diletakan di atas koloni bakteri yang telah diratakan diatas media. Kemudian di inkudasi selama 24 jam. Apabila terjadi bening disekitar kertas menandakan bakteri resisten terhadap bakteri- bakteri lain.

3.4.3. Isolasi DNA Bakteri Probiotik

Kultur cair bakteri dimasukan kedalam mikro tube 1,5 ml, kemudian disentrifuse menggunakan *Homogenizer Tomy MS-100R* , hingga didapat pellet 50-100 mgr. Cairan supernatan dibuang. Kemudian ditambah 300 µl DW, 30 µl protease, 30 µl RNAse, 30 µl SDS 1%. Inkubasi selama 15 menit dengan suhu 37⁰C. Tambahkan 400 µl saturate phenol, kemudian vortek selama 1 menit. Sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 g selama 5 menit pada suhu ruangan. Kemudian pindahkan supernatan ke dalam mikrotube yang baru. Tambahkan 400 µl choloroform- isoamyl alkohol, kemudian divortek selama 30 detik. Sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 g selama 5 menit pada suhu ruangan. Pindahkan 300 µL supernatan ke dalam mikrotube baru. Kemudian tambahkan 30 µL 3 M sodium acetat dan 750 µL ethonol absolut kemudian divortek. Simpan pada suhu -85⁰C selama 15 menit atau lebih. Sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 g selama 5 menit dalam suhu ruangan. Supernatan dibuang, tambahkan 1500 µL 75% etanol, campurkan dengan baik. Kemudian sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 g selama 2 menit. Buang supernatan, tambahkan 1200 µL ethanol absolut, campurkan dengan baik. Sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 g selama 2 menit. Buang ethanol dan keringkan dalam desikator selama 10 menit. Setelah kering tambahkan 50 – 200 µl aquades steril. Simpan DNA pada suhu 4 ⁰C dan siap digunakan.

3.4.4. Reaksi Polimerisasi Berantai

Empat komponen utama dalam PCR yaitu: 1). DNA *template* (cetakan), yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandakan; 2). Oligonukleotida *primer*, yaitu



suatu sekuen oligonukleotida pendek (15-25 nukleotoda) yang digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA; 3). Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP *mix*), terdiri atas dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 4). Enzim polimerase, yaitu enzim yang digunakan untuk melakukan katalis reaksi sintesis rantai DNA.

Untuk reaksi PCR 16S volume 25 μ l, tube *appendorf* 0,2 ml diisi dengan aquades sebanyak 18,375 μ l, PCR Long Buffer 10x 2,5 μ l, MgCl₂ 1,5 μ l, primer (24F/1540R) sebanyak 1 μ l, DNA template sebanyak 1 μ l, dan dNTP mix 0,5 μ l, taq polymerase 0,125 μ l. Pengerjaan sampel dilakukan di dalam ruangan asam. Kemudian tabung mikro *appendorf* tersebut dimasukkan ke dalam mesin DNA thermal cycler. Program PCR 16S universal dijalankan dengan pengaturan suhu sebagai berikut: 1 siklus pada suhu 94 °C selama 2 menit (denaturasi), dilanjutkan 30 siklus dengan suhu 50 °C selama 40 detik (*annealing*), perpanjangan rantai (sintesis DNA) pada 72 °C selama 1 menit, dan suhu 94 °C selama 1 menit. Siklus lalu diulang sebanyak 25 kali. Pada siklus terakhir dilakukan pemanjangan rantai lebih lama pada suhu 72 °C selama 5 menit dan diisimpan pada suhu 4 °C. Untuk menghindari kerusakan bahan selama mempersiapkan sampel, semua bahan di dalam *coolbox* yang berisi es dan menggunakan sarung tangan setiap mempersiapkan sampel untuk menghindari kontaminasi.

3.4.5. Elektroforesis dan Pengamatan Hasil PCR

Sebelum elektroforesis, agarose ditimbang dengan perbandingan 1,5% (w/v) dengan larutan buffer TBE 0,5x. Buffer TBE 0,5x dengan volume 100 ml dimasukkan ke dalam erlenmeyer, lalu ditambah dengan agarose 1,5 gram yang telah ditimbang. Campuran dalam erlenmeyer dipanaskan dengan microwave sampai larut dan homogen. Setelah dikeluarkan dari microwave, kira-kira pada suhu 40-50 °C, CYBER SAFE 10.000x ditambahkan, lalu digoncang-goncang hingga larutan homogen. Larutan ini lalu dituang ke cetakan yang telah dipasang sisir untuk membuat gel berlubang dan tidak boleh ada gelembung gas. Setelah beku, sisir dilepas lalu cetakan bersama gel beku dimasukkan ke dalam wadah/bak elektroforesis dan direndam keseluruhan dalam buffer TBE 0,5x. Masing-masing lubang pada gel dimasukkan marker DNA (loading dye 6x). Switch dinyalakan dengan tegangan 100 V selama 30 menit. Kemudian gel diangkat



dimasukkan ke dalam itidium bromide selama 2 menit, kemudian dimasukkan ke dalam aguades selama 5 menit

Gel yang berisi visualisasi fragmen DNA diangkat lalu diletakkan di atas UV Trans Illuminator, Amati pita DNA yang muncul dan didokumentasikan menggunakan *Gel documentation System Digibox camera*.

3.4.6. Purifikasi Gel Elektroforesis

Bahan yang digunakan untuk purifikasi (*Kit High Pure PCR Product Purification, Roche Diagnostic GmbH, made in Germany*), terdiri dari tiga larutan, yaitu larutan 1 (*Binding Buffer*) yang berfungsi mencairkan gel agarose; larutan 2 (*Washing Buffer*) untuk mencuci DNA; dan larutan 3 (*Elution Buffer*) untuk melepaskan DNA dari matriks pengikat DNA. Purifikasi dilakukan pada gel elektroforesis berkonsentrasi 1 %.

Tabung 1,5 ml kosong yang akan digunakan ditimbang. Gel agarose yang mengandung fragmen DNA dipotong, lalu dimasukkan ke tabung yang sudah ditimbang. Tabung yang sudah berisi gel kembali ditimbang. Selisih berat tabung yang berisi gel dengan berat kosong (berat gel \pm 300mg) dihitung. Lalu ditambahkan 500 μ L buffer (larutan 1) pada sampel dan campur dengan cara divorteks. Inkubasi pada 55-60⁰ C selama 10-15 menit sampai semua agarose larut (bolak-balik tabung setiap 2-3 menit).

Setelah gel larut, sampel didinginkan hingga suhu ruang. DF kolom ditempatkan pada tabung 2 ml. Sampel dipindahkan ke DF kolom (lebih dari 700 μ L), lalu disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit.

Buang larutan dari tabung 2 ml kemudian tempatkan kembali DF kolom pada tabung 2 ml. 600 μ L *wash buffer* (larutan 2) ditambahkan, lalu disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit. Larutan dibuang dari tabung 2 ml, kemudian tempatkan kembali DF kolom pada tabung 2 ml. Kembali disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 3 menit. DF kolom dipindahkan ke tabung 1,5 ml yang baru. DNA dielusi dengan menambahkan 15-50 μ l *elution buffer* (larutan 3) di tengah-tengah membran DF kolom, lalu diinkubasi selama 2 menit. Disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 3 menit lalu DNA disimpan pada suhu 4⁰C.



3.4.7. Sekuensing DNA dan Analisis BLAST

Hasil purifikasi DNA disekuensing dengan menggunakan ABI 3130 XL *Genetic Analyzer Applied Biosistem*. Pada tahap sekuensing, semua tube 0,2 ml yang berisi sampel-sampel DNA yang telah dipurifikasi dimasukkan ke dalam mesin *AB 3130 Genetic Analyzer*. Sekuensing dijalankan dengan komputer menggunakan software AB 3130. Metode sekuensing ini berdasarkan metode yang diterapkan oleh Sazali (2008) dan Andrito (2007).

Analisis BLAST dilakukan dengan mengedit urutan DNA hasil sekuensing dengan menterjemahkan N menjadi basa sesuai elektroferogram. Urutan DNA dicopy ke program Notepad. Lalu dilakukan penelusuran melalui website <http://www.ncbi.nih.nlm.gov/>

3.5. Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil sekuensing dianalisis menggunakan teknik BLAST, paket program Clustal X, Genedoc, Treeview dan Bioedit. Kemudian hasil analisis disajikan secara deskriptif dalam bentuk tabel dan gambar.

2	SU	Batang Panjang	Kiri Trans	Spiral
3	SWU	Batang Pendek	Pilih Trans	Kizoid
4	TU	Batang Pendek	Pilih Sisi	S-waring

Sumber: Data Primer

Dari hasil pengamatan morfologi dan pewarnaan gram dapat dilihat perbedaan pada masing – masing isolat. Namun untuk memastikan dari ke empat isolat tidak ada bakteri *Vibrio Sp* yang tumbuh, masing – masing isolat dituangkan ke medium TCBS-agar. Setelah dirinkubasi selama 24 jam, isolat TU tumbuh secara normal, sehingga untuk uji lebih lanjut hanya 3 isolat yang dilakukan.

4.1.2. Uji Biokimia

Hasil uji biokimia identifikasi bakteri yang dilakukan berdasarkan acuan buku Cowan and Steel's (1992). Dengan berpedoman pada serentakan uji morfologi dan biokimia yaitu uji pewarnaan Gram, pengamatan bentuk sel, uji motilitas, sifat aerobik dan anaerobik, uji katalase, uji oksidase, glukosa acid, karbohidrat, kemampuan tumbuh pada konsentrasi NaCl yang berbeda (10% dan 6%), mereduksi nitrat, indol, ONPG, VP (voges – Proskauer), hidrolisis starch,

