

**MEDIA TUMBUH SPORA ALTERNATIF TERHADAP SPORULASI DAN  
EFISIENSI SPORULASI *Bacillus megaterium***

**TESIS**



Oleh :  
**I MADE DEDI MAHARIAWAN**  
**NIM. 186080100111010**

**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN  
MINAT PAKAN**

**PROGRAM PASCASARJANA  
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2019**



**MEDIA TUMBUH SPORA ALTERNATIF TERHADAP SPORULASI DAN  
EFISIENSI SPORULASI *Bacillus megaterium***

**TESIS**



Oleh :  
**I MADE DEDI MAHARIAWAN**  
**NIM. 186080100111010**

**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN  
MINAT PAKAN**

**PROGAM PASCA SARJANA  
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2019**



TESIS

**MEDIA TUMBUH SPORA ALTERNATIF TERHADAP SPORULASI DAN  
EFISIENSI SPORULASI *Bacillus megaterium***

Oleh:  
**I MADE DEDI MAHARIAWAN**  
NIM. 186080100111010

Telah dipertahankan didepan penguji  
Pada tanggal 13 Desember 2019  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

**Menyetujui,  
Komisi Pembimbing**

**Ketua**

**Anggota**

**Dr. Ir. Anik Martinah Hariati, M.Sc**

**NIP. 19610310 198701 2 001**

**Tanggal: 23 DEC 2019**

**Dr. Ating Yuniarti, S.Pi, M. Aqua**

**NIP. 19750604 199903 2 002**

**Tanggal: 23 DEC 2019**

**Mengetahui,**

**Dekan**

**Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan**



**Prof. Dr. Ir. Happy Nursyam, MS**

**NIP. 19600322 198601 1 001**

**Tanggal: 23 DEC 2019**

**Ketua**

**Program Magister**

**Prof. Dr. Ir. Maftuch, M.Si**

**NIP. 19660825 199203 1 001**

**Tanggal: 23 DEC 2019**

**JUDUL TESIS:**

**MEDIA TUMBUH SPORA ALTERNATIF TERHADAP SPORULASI DAN EFISIENSI SPORULASI *Bacillus megaterium***

**IDENTITAS MAHASISWA**

**NAMA : I Made Dedi Mahariawan**

**NIM : 186080100111010**

**PROGRAM STUDI : BUDIDAYA PERAIRAN**

**MINAT : PAKAN**

**KOMISI PEMBIMBING**

**KETUA : Dr. Ir. Anik Martinah Hariati, MSc**

**NIP : 19610310 198701 2 001**

**ANGGOTA : Dr. Ating Yuniarti, S.Pi., M. Aqua**

**NIP : 19750604 199903 2 002**

**KOMISI PENGUJI**

**PENGUJI 1 : Dr. Ir. Mohamad Fadjar, M.Sc**

**NIP : 196210141987011001**

**PENGUJI 2 : Wahyu Endra Kusuma, S.Pi, MP, D.Sc**

**NIP : 19820826 200912 1 002**

**UJIAN KELAYAKAN : 08 November 2019**

**SEMINAR PROPOSAL : 13 November 2019**

**SEMINAR HASIL : 03 Desember 2019**

**UJIAN TESIS : 13 Desember 2019**



## PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil penelitian atau karya saya sendiri dan sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali kutipan yang tertulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan tesis ini hasil penjiplakan (plagiasi), maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut, sesuai hukum yang berlaku di Indonesia.

Malang, 13 Desember 2019

Mahasiswa,

  
Dedi Mahariawan  
NIM. 186080100111010

**DAFTAR RIWAYAT HIDUP**

**I Made Dedi Mahariawan**, lahir pada tanggal 06 Agustus 1994 di Desa Patas, Kecamatan Gerokgak, Kabupaten Buleleng, Bali. Putra dari bapak I Gede Sumahardika dan Ni Luh Lotreni, S.Pd. Penulis merupakan anak ke-dua dari dua bersaudara. Penulis menempuh pendidikan taman kanak-kanak di TK Sanggakumara Sanggalangit pada tahun 2000-2001. Pendidikan sekolah dasar ditempuh di SD Negeri 2 Patas pada tahun 2001-2007. Pendidikan sekolah menengah pertama ditempuh di SMP Negeri 1 Gerokgak pada tahun 2007-2010. Pendidikan sekolah menengah atas ditempuh di SMAN 1 Singaraja pada tahun 2010-2013. Pendidikan Strata 1 (S1/Sarjana) ditempuh di Program studi Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang pada tahun 2013-2017. Penulis melanjutkan studi S2 pada program studi Budidaya Perairan, Pascasarjana Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang dan termasuk dalam angkatan 2018 semester ganjil.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa yang telah memberikan karunia dan memberikan petunjuk kepada penulis sehingga naskah tesis ini dapat terselesaikan dengan baik. Penyusunan laporan penelitian tesis ini tidak lepas dari dukungan dan bantuan dari berbagai pihak. Penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Orang Tua saya, Bapak I Gede Sumahardika dan Ibunda tercinta Ni Luh Lotreni, S.Pd serta kakak saya Ni Luh Desi Mahariani yang sangat penulis sayangi yang tiada henti-hentinya mengirimkan doa kepada penulis.
2. Dr. Ir. Anik Martinah Hariati, M.Sc dan Dr. Ating Yuniarti, S.Pi., M.Aqua selaku komisi pembimbing yang telah meluangkan banyak waktu dan atas segala arahan, saran bimbingan serta ilmu yang diberikan kepada penulis.
3. Dr. Ir. Mohamad Fadjar, M.Sc dan Wahyu Endra Kusuma, S.Pi, MP, D.Sc selaku dosen penguji atas kritik dan saran sehingga penulis semakin baik dalam penyusunan laporan tesis.
4. KEMENRISTEK DIKTI melalui beasiswa Pendidikan Magister Menuju Doktor untuk Sarjana Unggul (PMDSU) yang telah memberikan beasiswa penuh, sehingga penulis dapat melanjutkan pendidikan.
5. Seluruh pihak yang telah membantu terselesaikannya laporan tesis ini yang tidak bisa penulis sebutkan satu-persatu.

Malang, 13 Desember 2019

Penulis

## RINGKASAN

**I Made Dedi Mahariawan.** Program Magister Budidaya Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya. **Media Tumbuh Spora Alternatif Terhadap Sporulasi dan Efisiensi Sporulasi *Bacillus megaterium*. Tesis.** Ketua Komisi Pembimbing Dr. Ir. Anik Martinah Hariati, M.Sc dan Anggota Komisi Pembimbing Dr. Ating Yuniarti, S.Pi., M.Aqua

---

Pemanfaatan probiotik sebagai *feed additive* semakin berkembang di kalangan pembudidaya sejalan dengan penerapan sistem budidaya intensif. Akan tetapi, probiotik yang umumnya beredar masih dalam bentuk sel vegetatif yang bersifat tidak aktif apabila berada pada kondisi yang kurang menguntungkan (seperti misalnya pH asam dan suhu ekstrim). Salah satu upaya untuk mengatasi permasalahan tersebut yaitu dengan memanfaatkan spora bakteri sebagai kandidat probiotik. *B. megaterium* merupakan bakteri yang dapat membentuk endospora dan memiliki exosporium pada lapisan luar spora untuk meningkatkan perlekatan pada dinding usus suatu organisme. Produksi spora *Bacillus* memerlukan media tumbuh sebelum digunakan sebagai probiotik. Akan tetapi, media tumbuh komersil telah umum digunakan dan memiliki harga relatif mahal serta susah diperoleh seperti misalnya glukosa dan laktat. Media alternatif mulai dikembangkan untuk memproduksi spora yang berasal dari produk pertanian diantaranya yaitu tepung terigu, tepung tapioka dan tepung jagung yang menyediakan sumber karbon organik lebih dari 37%.

Tujuan dari penelitian ini adalah (1) untuk mendapatkan *low cost medium* dengan dosis karbon yang sesuai dalam memproduksi spora *B. megaterium* (2) Mendapatkan kondisi lingkungan (suhu dan pH) yang optimal dalam memproduksi spora *B. megaterium* dan (3) Menganalisis perbedaan karakter morfologi (ukuran) dan kualitas spora *B. megaterium* yang ditumbuhkan di media dan lingkungan optimal dengan media komersil.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini yaitu metode eksperimen dengan rancangan acak lengkap faktorial (RALF). Tahapan dalam pelaksanaan penelitian ini yaitu uji karakter *B. megaterium* pada sumber (tepung tapioka, tepung terigu dan tepung jagung) dan dosis karbon (5, 10, 15 dan 20 gram/liter) yang berbeda. Setelah mendapatkan sumber karbon dan dosis karbon terbaik, maka dilanjutkan pada pengujian suhu (37, 44 dan 51 °C) dan pH (4, 7 dan 10). Parameter yang diamati pada kedua uji ini yaitu kepadatan sel vegetatif, kepadatan spora, efisiensi sporulasi, germinasi spora, *growth rate* vegetatif dan spora, waktu generasi vegetatif *B. megaterium*. Selain itu, penelitian ini juga mengamati morfologi dan ukuran spora *B. megaterium* yang ditumbuhkan pada rumusan media alternatif yang optimal.

Hasil penelitian tahap 1 menunjukkan bahwa kepadatan sel vegetatif tertinggi pada masing-masing media yaitu tepung tapioka dosis 15 g/L ( $8,3 \times 10^7$  sel/ml), tepung terigu dosis 15 g/L ( $1,7 \times 10^9$  sel/ml) dan tepung jagung dosis 20 g/L ( $6,7 \times 10^7$  sel/ml). Kepatan spora pada tepung terigu dengan dosis 15 g/L tertinggi di semua perlakuan ( $1,5 \times 10^9$  spora/ml), tepung tapioka 15 g/l ( $4,1 \times 10^7$



spora/ml) dan tepung jagung ( $3,3 \times 10^7$  spora/ml). Efisiensi sporulasi tertinggi yaitu pada tepung terigu 91,30% (dosis 10 g/l). Laju pertumbuhan vegetatif, spora dan waktu generasi tertinggi pada dosis 15 g/l secara berturut-turut yaitu 48 /menit, 48,52 /menit dan 40,80 /menit. Hasil penelitian tahap 2 yaitu suhu  $37^\circ\text{C}$  dengan pH 10 menghasilkan vegetatif ( $1,1 \times 10^9$  sel/ml) dengan spora yang dihasilkan ( $1 \times 10^9$  spora/ml). Suhu  $44^\circ\text{C}$  pada pH 10 dengan kepadatan vegetatif ( $8,5 \times 10^7$  sel/ml) dan spora ( $4,6 \times 10^7$  spora/ml). Suhu  $51^\circ\text{C}$  pada pH 7 dengan kepadatan vegetatif ( $3,7 \times 10^7$  sel/ml) dan spora ( $3 \times 10^7$  spora/ml). Efisiensi sporulasi tertinggi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  yaitu 90,61% pada pH 7. Laju pertumbuhan vegetatif, spora dan waktu generasi tertinggi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  dengan pH 10 secara berturut-turut yaitu 39 /menit, 63,01 /menit dan 33 /menit. Germinasi tertinggi pada media optimal yaitu  $9,8 \times 10^8$  sel/ml. Ukuran spora yang didapat pada media optimal yaitu berkisar antara 1,35-1,39  $\mu\text{m}$ .



## SUMMARY

**I Made Dedi Mahariawan**. Post Graduate Student of Aquaculture, Fisheries and Marine Science Faculty, Brawijaya University. **Alternative Spore Growth Media on Sporulation and Sporulation Efficiency of *Bacillus megaterium***. Thesis. Adviser **Dr. Ir. Anik Martinah Hariati, M.Sc** and co-adviser **Dr. Ating Yuniarti, S.Pi., M.Aqua**

---

The use of probiotics as feed additives is increasingly developing among farmers in line with the application of intensive aquaculture systems. However, probiotics are still in the form of vegetative cells that are inactive when in harsh conditions (such as acidic pH and extreme temperatures). One effort to overcome these problems is by utilizing bacterial spores as probiotic candidates. *B. megaterium* is a bacterium that can form endospores and has an *exosporium* in the outer layer of spores to increase attachment to the intestinal wall of an organism. *Bacillus* spore production requires growing media before being used as a probiotic. However, commercial growth media are commonly used and have relatively high prices and are difficult to obtain such as glucose and lactate. Alternative media began to be developed to produce spores derived from agricultural products including wheat flour, tapioca flour and corn flour which provide an organic carbon source of more than 37%.

The objectives of this study were (1) to obtain low-cost medium with an appropriate carbon dose in producing *B. megaterium* spore, (2) obtain optimal environmental conditions (temperature and pH) in producing *B. megaterium* spores and (3) analyze differences in character morphology (size) and quality of *B. megaterium* spores grown in the media and optimal environment with commercial media.

The method used in this is the experimental method with a completely randomized factorial design (RALF). The stages in the implementation of this research were the character test of *B. megaterium* at different carbon sources (tapioca flour, wheat flour and corn flour) and carbon doses (5, 10, 15 and 20 grams / liter). After getting the best carbon source and carbon dose, then proceed to test the temperature (37, 44 and 51 °C) and pH (4, 7 and 10). The parameters observed in these two tests were vegetative cell density, spore density, sporulation efficiency, spore germination, vegetative and spore growth rates and generation time of vegetative cell. In addition, this study also looked at the morphology and size of *B. megaterium* spores grown on optimal alternative media formulations.

The results of stage 1 research showed that the highest vegetative cell density in each medium was tapioca flour with a dose of 15 g / L ( $8.3 \times 10^7$  cells / ml), wheat flour with a dose of 15 g / L ( $1.7 \times 10^9$  cells / ml) and corn flour at 20 g / L ( $6.7 \times 10^7$  cells / ml). The spore rate of flour was 15 g / L highest in all treatments ( $1.5 \times 10^9$  spore/ml), tapioca flour 15 g / l ( $4.1 \times 10^7$  spore/ml) and corn flour ( $3.3 \times 10^7$  spore/ml). The highest sporulation efficiency was 91.30% in wheat flour (dose of 10 g/l). The highest growth rate vegetative cell, spore and generation time were wheat flour with a dose of 15 g/L (48 /minutes, 48.52 /minutes and 40.80/minutes,

respectively). The results of the second phase of the study of vegetative cells were temperature 37 °C with a pH of 10 ( $1.1 \times 10^9$  cells / ml) with the resulting spores ( $1 \times 10^9$  spore/ml). Temperature of 44 °C with vegetative density ( $8.5 \times 10^7$  cells/ml) and spores ( $4.6 \times 10^7$  spore/ml). Temperature 51 °C with vegetative density ( $3.7 \times 10^7$  cells / ml) and spores ( $3 \times 10^7$  spore/ml). The efficiency of sporulation was highest at 37°C at 90.61% at pH 7. The highest maximum growth rate vegetative, spore, and generation time were temperature 37 °C with a pH of 10 (39 /minutes, 63.01 /minutes and 33 /minutes, respectively). The highest germination was in optimal media ( $9.8 \times 10^8$  cells/ml). Size of spore in optimal media between 1.35 – 1.39  $\mu$ m.



## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa atas berkah, karunia serta ridlo-Nya penulis dapat menyelesaikan laporan tesis dengan judul: "Media Tumbuh Spora Alternatif Terhadap Sporulasi dan Efisiensi Sporulasi *B. megaterium*". Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Ibu Dr. Ir. Anik Martinah Hariati, M.Sc selaku dosen pembimbing 1 dan Ibu Dr. Ating Yuniarti, S.Pi, M.Aqua selaku dosen pembimbing 2.

Penulis mengharapkan kritik dan saran yang dapat membangun dari semua pihak. Kritik konstruktif dari pembaca sangat diharapkan untuk penyempurnaan laporan selanjutnya, agar tulisan ini dapat bermanfaat, demikian penulis sampaikan terimakasih.

Malang, 13 Desember 2019

Penulis



DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	<b>ii</b>
<b>PERNYATAAN ORISINALITAS</b> .....	<b>v</b>
<b>DAFTAR RIWAYAT HIDUP</b> .....	<b>vi</b>
<b>UCAPAN TERIMA KASIH</b> .....	<b>vii</b>
<b>RINGKASAN</b> .....	<b>viii</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>x</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>xii</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xv</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xvi</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xvii</b>
<b>1. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan.....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>6</b>
2.1 Biologi <i>B. megaterium</i> .....	6
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi <i>B. megaterium</i> .....	6
2.1.2 Habitat dan Penyebaran <i>B. megaterium</i> .....	7
2.1.3 Fase Pertumbuhan Bakteri.....	8
2.2 Spora, Sporulasi dan Germinasi <i>B. megaterium</i> .....	10
2.3 Struktur dan Kandungan Spora <i>B. megaterium</i> .....	12
2.4 Pengaruh Sumber dan Dosis Karbon Terhadap Produksi Spora.....	14
2.5 Pengaruh Suhu dan pH Terhadap Produksi Spora.....	16
2.6 Probiotik dan Mekanismenya.....	17
2.7 Spora <i>Bacillus</i> sebagai Probiotik.....	22
2.8 Media Tumbuh Alternatif Spora <i>Bacillus</i> .....	25
2.9 Kepadatan Vegetatif dan Kepadatan Spora.....	26
2.10 Efisiensi Sporulasi.....	26
2.11 Laju Pertumbuhan dan Waktu Generasi.....	27
2.12 Pengamatan Morfologi Spora melalui SEM.....	28
<b>3. KERANGKA KONSEP PENELITIAN</b> .....	<b>30</b>
3.1 Landasan Teori.....	30
3.2 Kerangka Konsep Penelitian.....	32
3.3 Kerangka Operasional.....	33
3.4 Kebaruan Penelitian.....	34
3.5 Hipotesis Penelitian.....	36
3.6 Strategi Publikasi.....	36
<b>4. MATERI DAN METODE PENELITIAN</b> .....	<b>38</b>
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	38
4.2 Materi Penelitian.....	38
4.3 Alat dan Bahan Penelitian.....	38
4.3.1 Alat – Alat Penelitian.....	38
4.3.2 Bahan Penelitian.....	41



4.4	Metode Penelitian .....	43
4.5	Rancangan Penelitian .....	43
4.5.1	Rancangan Penelitian Tahap 1 .....	44
4.5.2	Rancangan Penelitian Tahap 2 .....	45
4.6	Eksplorasi Media Tumbuh Spora <i>B. megaterium</i> .....	46
4.7	Prosedur Penelitian .....	47
4.7.1	Kultur dan Peremajaan Isolat Bakteri <i>B. megaterium</i> .....	47
4.7.2	Produksi Spora pada Sumber dan Dosis Karbon yang Berbeda .....	48
4.7.3	Produksi Spora pada Beberapa Suhu dan pH .....	50
4.7.4	Pertumbuhan Sel Vegetatif <i>B. megaterium</i> .....	51
4.7.5	Produksi Spora <i>B. megaterium</i> .....	52
4.7.6	Efisiensi Sporulasi <i>B. megaterium</i> .....	54
4.7.7	Perkecambah <i>B. megaterium</i> .....	54
4.7.8	Growth Rate (GR) Sel Vegetatif dan Spora <i>B. megaterium</i> .....	55
4.7.9	Generation Time (GT) Sel Vegetatif <i>B. megaterium</i> .....	55
4.7.10	Pewarnaan Spora <i>B. megaterium</i> .....	56
4.7.11	Karakter Morfologi (Ukuran) Spora <i>B. megaterium</i> dengan menggunakan SEM (Scanning Electron Microscopy) .....	56
4.8	Analisa Data .....	57
<b>5.</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>59</b>
5.1	Penelitian Tahap 1 .....	59
5.1.1	Kepadatan Sel Vegetatif .....	59
5.1.2	Kepadatan Spora .....	64
5.1.3	Efisiensi Sporulasi .....	69
5.1.4	Laju Pertumbuhan dan Waktu Generasi Sel Vegetatif .....	72
5.1.5	Laju Pertumbuhan Spora .....	74
5.2	Tahap 2 .....	76
5.2.1	Kepadatan Sel Vegetatif .....	76
5.2.2	Kepadatan Spora .....	80
5.2.3	Efisiensi Sporulasi .....	83
5.2.4	Laju Pertumbuhan dan Waktu Generasi Sel Vegetatif .....	85
5.2.5	Laju Pertumbuhan Maksimum Spora .....	87
5.3	Tahap 3 .....	89
5.3.1	Germinasi Spora <i>B. megaterium</i> .....	89
5.3.2	Morfologi dan Ukuran Spora Melalui SEM .....	91
<b>6.</b>	<b>KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>93</b>
6.1	Kesimpulan .....	93
6.2	Saran .....	93
	<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>94</b>
	<b>GLOSARIUM .....</b>	<b>116</b>
	<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>118</b>

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Morfologi <i>B. megaterium</i> .....	7
2. Kurva Pertumbuhan Bakteri.....	8
3. Skema Siklus Sporulasi Bakteri <i>Bacillus megaterium</i> .....	11
4. Proses Germinasi Spora Bacillus.....	12
5. Spora <i>B. megaterium</i> dengan Menggunakan Mikroskop Elektron.....	13
6. Mekanisme Probiotik <i>Streptomyces</i> dan Aplikasinya dalam Akuakultur .....	21
7. Mekanisme Fungsi Probiotik pada Budidaya Udang .....	22
8. Skema Seleksi Mikroorganismen sebagai Kandidat Probiotik.....	23
9. Model Spora di Saluran Pencernaan Udang .....	24
10. Diagram Skematik Komponen Inti dari SEM. ....	29
11. Spora <i>B. subtilis</i> dengan Perlakuan DMSO yang Diamati dengan SEM.....	29
12. Kerangka Konsep Penelitian .....	32
13. Kerangka Operasional Penelitian.....	33
14. Denah Penelitian Perbedaan Sumber dan Dosis Karbon.....	44
15. Denah Penelitian Suhu dan pH.....	45
16. Fase Pertumbuhan Vegetatif <i>B. megaterium</i> di Media dan Dosis karbon ....	60
17. Fase Produksi Spora <i>B. megaterium</i> di Media dan Dosis Karbon .....	65
18. Rata-rata Efisiensi Sporulasi <i>B. megaterium</i> di Media dan Dosis Karbon.....	69
19. Pertumbuhan Sel Vegetatif di Bawah Perbedaan Suhu dan pH.....	77
20. Kepadatan Spora dibawah Perbedaan Suhu dan pH.....	81
21. Efisiensi Sporulasi <i>B. megaterium</i> di bawah Kondisi Suhu dan pH .....	84
22. Perbandingan Germinasi Spora pada Media Optimal dan Media Komersil ..	89
23. Perbedaan Morfologi Spora pada Berbagai Media.....	91

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Penelitian Terdahulu yang Menggunakan Media Tumbuh Alternatif.....	34
2. Strategi Publikasi.....	37
3. Peralatan Penelitian.....	39
4. Bahan Penelitian.....	41
5. Rasio C:N Sumber Karbon dan Nitrogen.....	49
6. Kepadatan Sel Vegetatif <i>B. megaterium</i> Waktu Inkubasi 5 Jam.....	62
7. Kepadatan Sel Vegetatif <i>B. megaterium</i> Waktu Inkubasi 10 Jam.....	63
8. Kepadatan Sel Vegetatif <i>B. megaterium</i> Waktu Inkubasi 18 Jam.....	63
9. Produksi Spora <i>B. megaterium</i> Waktu Inkubasi 36 Jam.....	67
10. Produksi Spora <i>B. megaterium</i> Waktu Inkubasi 84 Jam.....	67
11. Produksi <i>B. megaterium</i> Waktu Inkubasi 108 Jam.....	67
12. Pertumbuhan Sel Vegetatif <i>B. megaterium</i> Setiap Kombinasi Perlakuan.....	73
13. Laju Pertumbuhan Spora Bakteri <i>B. megaterium</i> .....	75
14. Kepadatan Sel Vegetatif pada Waktu Inkubasi 4 jam ( $\times 10^7$ sel/ml).....	79
15. Kepadatan Sel Vegetatif pada Waktu Inkubasi 12 jam ( $\times 10^9$ sel/ml).....	79
16. Kepadatan Sel Vegetatif pada Waktu Inkubasi 20 jam ( $\times 10^8$ sel/ml).....	79
17. Kepadatan Spora pada Waktu Inkubasi 18 Jam ( $\times 10^8$ sel/ml).....	82
18. Kepadatan Spora pada Waktu Inkubasi 60 Jam ( $\times 10^8$ sel/ml).....	82
19. Kepadatan Spora pada Waktu 108 Jam ( $\times 10^9$ sel/ml).....	83
20. Perbedaan Pertumbuhan dibawah Suhu dan pH yang Berbeda.....	86
21. Laju Pertumbuhan Maksimum Spora <i>B. megaterium</i> .....	88
22. Kepadatan Germinasi Spora pada Media Optimal dengan Komersil.....	90





DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Alat-Alat Penelitian yang Digunakan.....	118
2. Bahan Penelitian yang Digunakan.....	121
3. Dokumentasi Kegiatan.....	123
4. Kurva Optical Density B. megaterium.....	125
5. Prosedur Pengujian SEM spora B. megaterium.....	126
6. Data Hasil Statistik Menggunakan Aplikasi SPSS.....	127



## 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Pakan merupakan komponen penting yang menunjang keberhasilan produksi budidaya ikan. Menurut Rana, *et al.* (2009), ketersediaan pakan dalam kegiatan budidaya memiliki kontribusi sekitar 50-70% dari total biaya produksi. Sementara itu, tingginya harga pakan yang telah beredar di pasar tidak sepenuhnya mampu memenuhi kebutuhan nutrisi ikan. Harga pakan yang tinggi dengan kualitas rendah merupakan faktor penghambat perkembangan industri akuakultur. Kualitas pakan ikan berdampak pada hasil produksi budidaya (Gabriel, *et al.*, 2007; Patwary, *et al.*, 2013). Salah satu usaha yang dilakukan untuk meningkatkan kualitas pakan ikan dan mengurangi biaya produksi yang berpengaruh pada pertumbuhan dan efisiensi pakan yaitu dengan pemberian probiotik sebagai bahan tambahan (*feed additive*) (Mulyasari, *et al.*, 2016).

Penambahan probiotik semakin berkembang di kalangan pembudidaya karena memiliki beberapa keuntungan yaitu meningkatkan fungsi saluran pencernaan ikan (Sorokulova, 2013), meningkatkan respon imun (Cruz, *et al.*, 2012) dan mengurangi konsentrasi amonia dan nitrit di media pemeliharaan (Buruiana, *et al.*, 2014). Akan tetapi pemanfaatan probiotik dalam bentuk sel vegetatif telah umum digunakan dan memiliki beberapa kelemahan yaitu kelangsungan hidup rendah (Wolken, *et al.*, 2003), tidak aktif pada kondisi lingkungan seperti suhu 40-60 °C (Santivarangkna, *et al.*, 2008), pH ekstrim (pH 4,3) (Cotter dan Hill, 2003; Ceuppen, *et al.*, 2012) dan kurangnya ketersediaan unsur karbon (Corcoran, *et al.*, 2005) serta tidak dapat disimpan dalam waktu lama seperti *Lactobacillus* hanya mempunyai daya simpan sekitar 1 tahun dengan suhu penyimpanan 25 °C (Panel, *et al.*, 2013). Kondisi tersebut berbeda dengan spora yang lebih resisten terhadap lingkungan ekstrim (Clavel, *et al.*, 2004).

Spora merupakan bentuk dorman dari bakteri pembentuk endospora seperti *Bacillus* dan memiliki resistensi terhadap stres lingkungan seperti misalnya panas, radiasi, desikasi dan bermacam-macam zat kimia beracun (Chęcinska, *et al.*, 2015; Soni, *et al.*, 2016). Spora bakteri dapat bertahan hidup dalam waktu yang lama bahkan mencapai ratusan tahun (Setlow, *et al.*, 2006). Kelebihan spora *Bacillus* sebagai probiotik yaitu memiliki kemampuan bertahan hidup pada pH yang sangat asam yaitu berkisar 2-2,5 dan berpoliferasi di usus (Ananthanarayanan dan Dubhashi, 2016), resisten terhadap suhu ekstrim dan kekurangan nutrisi (Berendsen, *et al.*, 2016) serta dapat disimpan dalam bentuk kering selama ratusan tahun (Setlow, *et al.*, 2006; Cutting, 2011).

Beberapa *Bacillus* yang telah digunakan sebagai probiotik dalam bentuk spora yaitu *B. subtilis*, *B. clausii*, *B. cereus*, *B. coagulans* dan *B. licheniformis* (Buruiana, *et al.*, 2014). Spesies *Bacillus* lain yang dapat digunakan sebagai kandidat probiotik dalam bentuk spora yaitu *B. megaterium* (Mehnaz, 2017). Karakteristik khusus spora bakteri ini yaitu memiliki lapisan luar spora atau lebih dikenal sebagai *exosporium* yang berperan penting untuk penempelan spora di suatu permukaan salah satunya pada dinding usus suatu organisme (Soni, *et al.*, 2016). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Wangka-Orm, *et al.* (2014), penambahan spora *Bacillus* ke pakan udang galah *post-larva* (PL) 15 sebanyak 200 mL/kg menunjukkan adanya peningkatan berat udang galah mencapai 46 gram dari berat awal 13 gram selama 90 hari pemeliharaan.

Media tumbuh spora merupakan media biakan yang berperan penting sebagai penyedia nutrisi untuk mikroorganisme. Menurut Zhao, *et al.* (2008), media fermentasi untuk spora bakteri sebaiknya diperkaya dengan nutrisi tambahan. Penambahan sumber karbon seperti glukosa dan sukrosa pada media fermentasi dapat meningkatkan produksi spora sebesar 35% dan 25%. Ketersediaan sumber karbon sebagai media tumbuh spora merupakan komponen

penting yang menginisiasi pembentukan spora bakteri yaitu sebagai unsur pembentuk sel dan sumber energi (Aislabie dan Deslippe, 2013). Media tumbuh spora sebaiknya memiliki bahan dan peralatan murah dan bersifat ramah lingkungan (Adams, *et al.*, 2002; El-Bendary, 2006). Umumnya, media tumbuh spora berasal dari produk komersil yang memiliki harga relatif mahal dan susah diperoleh seperti misalnya glukosa dan laktat (de Vries, *et al.*, 2005; Nimrat dan Vuthiphandchai, 2011).

Penelitian mengenai pemanfaatan sumber karbon alternatif mulai dikembangkan untuk menggantikan penggunaan media komersil. Berbagai studi sebelumnya menggunakan sumber karbon dari ekstrak kentang dapat memproduksi spora tertinggi yaitu  $1,24 \times 10^{10}$  cfu/ml (Dhingra dan Chaundry, 2009), penggunaan media lokal dengan suplementasi tepung ikan sebanyak 5,86% juga menghasilkan spora sebesar  $8,56 \times 10^8$  spora/ml (Liu dan Tzeng, 2002). Namun berdasarkan penelitian yang membahas mengenai penggunaan sumber karbon alternatif belum dijelaskan mengenai pengaruh dari berbagai perbedaan dosis karbon dan optimasi lingkungan pada rasio C:N yang optimal untuk memproduksi spora. Beberapa produk pertanian lain yang dapat digunakan sebagai media tumbuh spora yaitu berasal dari produk lokal seperti umbi-umbian dan kacang-kacangan. Tepung tapioka, tepung terigu dan tepung jagung merupakan bahan yang tersedia melimpah dan terjangkau harganya. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pemanfaatan produk pertanian seperti tepung tapioka, tepung terigu dan tepung jagung sebagai media tumbuh spora *B. megaterium* dengan dosis dan optimasi lingkungan yang sesuai yang nantinya dapat menghasilkan spora untuk dijadikan sebagai kandidat probiotik.

## 1.2 Rumusan Masalah

Perkembangan bahan suplemen probiotik di kalangan pembudidaya semakin meningkat sejalan dengan penerapan sistem budidaya intensif. Akan tetapi, probiotik yang beredar masih menggunakan bakteri dalam bentuk sel vegetatif. Kelemahan dari bakteri sel vegetatif yaitu hampir sebagian besar sel vegetatif tidak aktif pada organ empedu dan kondisi asam di lambung selama melewati saluran pencernaan suatu organisme (Ceuppens, *et al.*, 2012). Salah satu upaya yang dilakukan untuk meningkatkan kualitas probiotik yaitu dengan menggunakan spora sebagai probiotik. Spora merupakan bentuk dorman dari bakteri untuk dapat hidup pada suatu kondisi lingkungan yang ekstrim (suhu 45-60 °C) (Martinez, *et al.*, 2016). Salah satu spesies bakteri yang dapat membentuk spora yaitu *B. megaterium*. Faktor penting yang mempengaruhi produksi spora *B. megaterium* yaitu media tumbuh spora. Efisiensi biaya dan efektifitas dari media biakan spora merupakan indikator penting untuk menunjang keberhasilan suatu produksi spora. Penggunaan media tumbuh spora dari produk pertanian (tepung tapioka, tepung terigu dan tepung jagung) dapat dijadikan sebagai alternatif untuk mengurangi biaya produksi spora. Media tumbuh spora alternatif dengan perbedaan media dan lingkungan diperlukan untuk mendapatkan media biakan optimal dalam memproduksi spora *B. megaterium*. Berdasarkan uraian diatas, maka rumusan masalah pada penelitian ini adalah :

1. Apakah kombinasi *low cost medium* dengan berbagai dosis karbon dapat mempengaruhi produksi spora *B. megaterium*?
2. Bagaimana pengaruh optimasi lingkungan (suhu dan pH) yang berbeda terhadap produksi spora *B. megaterium* pada *low cost medium*?
3. Apakah terdapat perbedaan karakter morfologi (ukuran) dan kualitas spora *B. megaterium* yang ditumbuhkan di media dan lingkungan optimal dengan media komersil?

### 1.3 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Mendapatkan kombinasi *low cost medium* dengan dosis karbon yang sesuai dalam memproduksi spora *B. megaterium*.
2. Mendapatkan kondisi lingkungan (suhu dan pH) yang optimal dalam memproduksi spora *B. megaterium*.
3. Menganalisis perbedaan karakter morfologi (ukuran) dan kualitas spora *B. megaterium* yang ditumbuhkan di media dan lingkungan optimal dengan media komersil.

### 1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian tesis ini adalah memberikan informasi tentang kemampuan media tumbuh spora alternatif yang berasal dari tepung tapioka, tepung terigu dan tepung jagung sebagai produk lokal yang berfungsi sebagai media biakan spora yang murah dan ramah lingkungan. Media alternatif tersebut dievaluasi dengan beberapa faktor (kombinasi sumber dan dosis karbon serta kombinasi suhu dan pH) yang dapat digunakan sebagai pengganti media komersil dalam memproduksi spora dan meningkatkan efisiensi sporulasi *B. megaterium* serta mengetahui karakter morfologi ukuran dan kualitas spora *B. megaterium*.

Penelitian ini diharapkan mampu memberikan kontribusi bagi perkembangan ilmu dan pengetahuan khususnya pada produksi spora *B. megaterium* pada media alternatif yang nantinya dapat digunakan sebagai kandidat probiotik dalam rangka mencegah tidak aktifnya probiotik dalam bentuk sel vegetatif saat melewati atau memasuki saluran pencernaan yang bersifat asam dari suatu organisme budidaya.

## 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Biologi *B. megaterium*

#### 2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi *B. megaterium*

Menurut De Vos, *et al.* (2009), klasifikasi *B. megaterium* yaitu sebagai berikut:

Kingdom : Bacteria

Filum : Firmicutes

Kelas : Bacilli

Ordo : Bacillales

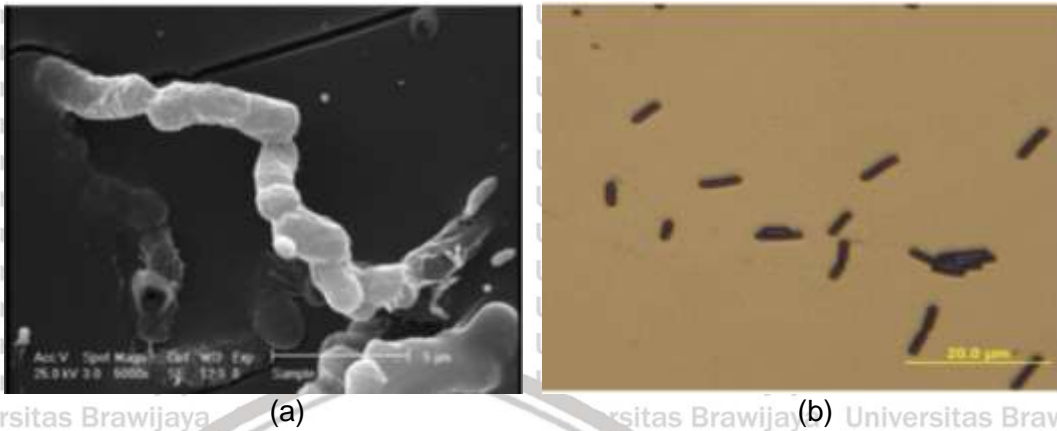
Famili : Bacillaceae

Genus : Bacillus

Spesies : *Bacillus megaterium*

Bakteri *B. megaterium* mempunyai bentuk batang dan termasuk ke dalam bakteri gram positif. Sel bakteri akan terlihat berwarna ungu apabila dilakukan pewarnaan gram karena kemampuan dinding selnya dalam mengikat pewarna primer. Bakteri ini bersifat aerobik dan anaerob fakultatif serta dapat membentuk spora untuk bertahan hidup dalam kondisi lingkungan yang ekstrim (Lopez, *et al.*, 2013; Eppinger, *et al.*, 2011). Umumnya genus *Bacillus* memproduksi enzim protease, amilase dan lipase (Latorre, *et al.*, 2016). Selain itu, bakteri ini juga memproduksi beberapa enzim lain yaitu mutarotase, glukosa dehidrogenase,  $\beta$ -galaktosidase dan selulase (Andriani, *et al.*, 2017). Andalib, *et al.* (2016) dan Liu, *et al.* (2014) menambahkan, karakteristik *B. megaterium* berdasarkan morfologi koloni yaitu memiliki elevasi datar, permukaan koloni yang halus dan berwarna krem. Selain itu, ukuran sel dari bakteri ini apabila diamati dibawah mikroskop yaitu memiliki lebar 0,5 – 1,0  $\mu\text{m}$  dan panjang 1,0 – 4,0  $\mu\text{m}$ . Bakteri ini merupakan bakteri

non-patogen atau bersifat tidak membahayakan organisme lain. Morfologi sel bakteri *B. megaterium* dapat dilihat pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Morfologi *B. megaterium* (a) *Scanning electron micrograph* (Yadzani, *et al.*, 2009) (b) Mikroskop Cahaya (Kandalah dan Ramsamy, 2015).

### 2.1.2 Habitat dan Penyebaran *B. megaterium*

Genus bakteri *Bacillus* merupakan mikroorganisme yang penyebarannya mudah ditemukan di alam, tanah, air dan udara (Olmos dan Paniagua-Michel, 2014). *B. megaterium* merupakan salah satu bakteri genus *Bacillus* yang termasuk ke dalam bakteri gram positif dan ditemukan di lingkungan yang luas dari tanah sampai air laut. Bakteri ini tumbuh dengan baik apabila ketersediaan sumber karbon di lingkungan tercukupi. Bakteri *B. megaterium* dapat hidup pada suhu 3 sampai 45 °C dengan suhu minimum untuk tumbuh yaitu 3-15 °C, suhu maksimum 35-45 °C dan optimum pada suhu sekitar 30 °C (Vary, *et al.*, 2007; De Vos, *et al.*, 2009).

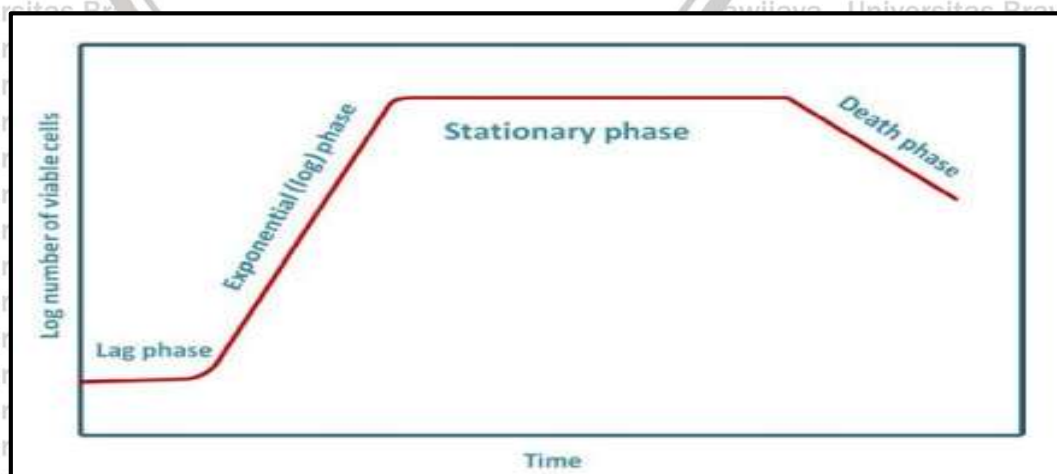
*B. megaterium* umumnya ditemukan di tanah yang merupakan habitat alami dari spesies ini. Bakteri ini juga ditemukan di lingkungan lain bahkan di kondisi lingkungan yang ekstrim seperti misalnya madu dan daging kering. Selain itu, spesies ini juga diisolasi dari air laut, sedimen dan ikan. Habitat yang luas dari *B. megaterium* mengakibatkan bakteri ini dapat melakukan metabolisme dengan toleransi ketersediaan sumber karbon dan tekanan osmotik yang tinggi (Vega, *et*



*al.*, 2016; Sura dan Hiremath, 2019). Bakteri ini termasuk ke dalam bakteri neutrofilik yaitu bakteri yang masih dapat bertahan hidup pada kondisi asam dengan menjaga integritas dinding sel atau membran sel. Golongan bakteri yang termasuk ke dalam bakteri neutrofilik dapat hidup pada pH 5-9 (Slonczewski, *et al.*, 2009; Goswani, *et al.*, 2018).

### 2.1.3 Fase Pertumbuhan Bakteri

Pengukuran pertumbuhan bakteri pada media kultur dalam beberapa rentang waktu tertentu dapat dilakukan melalui dua metode yaitu menghitung jumlah koloni bakteri yang tumbuh dan pengukuran panjang gelombang dari absorbansi suatu bakteri (Swinnen, *et al.*, 2004). Secara sederhana, model pertumbuhan bakteri yaitu ketika sel-sel menyesuaikan diri dengan kondisi pertumbuhan yang baru, kemudian melambat ketika nutrisi berkurang dan berhenti ketika ketersediaan nutrisi di lingkungan hidupnya habis (Williams, 1967). Terdapat 4 fase pertumbuhan bakteri yaitu (i) fase lag atau disebut juga sebagai fase non-replikasi, (ii) fase eksponensial yaitu tahapan replikasi dari bakteri, (iii) fase stasioner yaitu berhentinya proses replikasi karena ketersediaan nutrisi yang mulai berkurang dan (iv) fase kematian yaitu penurunan jumlah sel bakteri secara bertahap karena kondisi nutrisi di lingkungan yang habis (Bertrand, 2019). Model kurva pertumbuhan bakteri disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Kurva Pertumbuhan Bakteri (Shmeis, 2018)

Pertumbuhan bakteri mengacu pada peningkatan jumlah sel, tidak ukuran sel. Pertumbuhan bakteri merupakan sebuah proses yang kompleks yang melibatkan berbagai reaksi anabolik dan katabolik (Shmeis, 2018; Forget, *et al.*, 2018). Beberapa persyaratan yang dibutuhkan untuk dapat menumbuhkan mikroba yaitu dipengaruhi oleh dua faktor yaitu fisika dan kimia. Faktor fisika terdiri dari suhu, pH dan tekanan osmotik sedangkan faktor kimia meliputi makronutrien dan mikronutrien (Davis dan Cornwell, 2012; Madigan, *et al.*, 2014). Makronutrien melibatkan unsur-unsur yang terlibat dalam komposisi sel bakteri dan dibutuhkan dalam jumlah yang besar seperti karbon, hidrogen, nitrogen, oksigen, fosfor dan belerang. Akan tetapi, mikronutrien dibutuhkan dalam jumlah kecil dan mengandung unsur-unsur seperti Ca, Fe, K, Mg dan Na serta senyawa organik (vitamin) (Shmeis, 2018).

Bentuk kurva pertumbuhan bakteri umumnya memiliki perbedaan setiap spesies bergantung pada substrat pertumbuhan dan senyawa yang tersimpan di dalam sel bakteri yang mempengaruhi kompetisi antara mikroorganisme (Lou dan Reyes, 2005; Domanska, *et al.*, 2019). Fase adaptasi merupakan proses penyesuaian diri bakteri terhadap lingkungan baru yang menentukan proses pembelahan awal. Fase lag dipengaruhi oleh kondisi lingkungan baru dan jumlah inokulum (Schultz dan Kishony, 2013). Pada fase eskponensial terdapat produksi metabolit primer dalam bentuk kitinase (Azizah, *et al.*, 2015). Produk metabolit sekunder dihasilkan pada fase stasioner dan dapat dimanfaatkan oleh bakteri sebagai bentuk pertahanan terhadap kondisi yang tidak menguntungkan (Irma, *et al.*, 2018). Suhu dan pH lingkungan juga berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri. pH pada pertumbuhan mikroba mempengaruhi proses sel yaitu dapat mengubah struktur tiga dimensi komponen sel termasuk merusak fungsi protein. Di sisi lain, suhu yang meningkat menyebabkan molekul bergerak lebih cepat dan enzim akan mempercepat metabolisme sel (Isnawati dan Trimulyono, 2018).

## 2.2 Spora, Sporulasi dan Germinasi *B. megaterium*

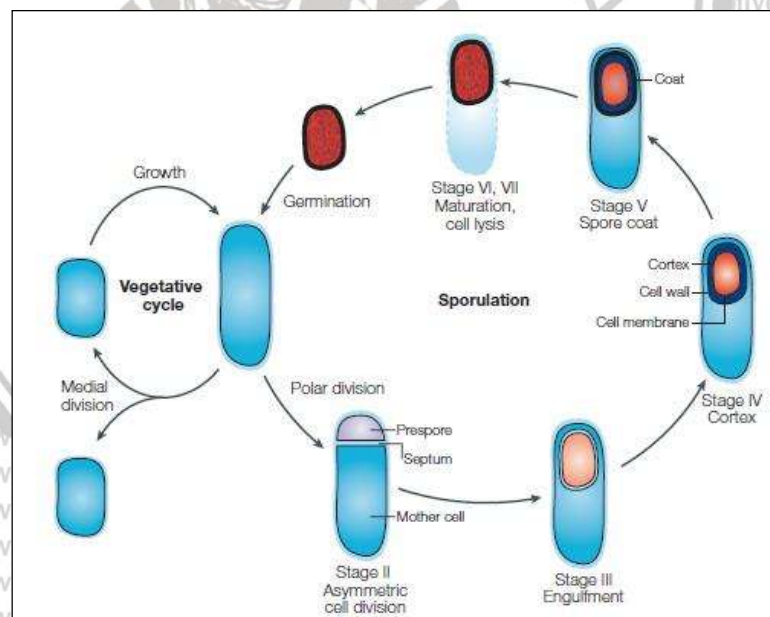
*Bacillus* merupakan bakteri gram positif dari filum Firmicutes yang dapat memproduksi spora (Poehlein, *et al.*, 2013). Kemampuan *Bacillus* untuk membentuk endospora mengakibatkan bakteri ini memiliki kelangsungan hidup yang lama dan kelulushidupan yang tinggi dari pengaruh tekanan, khususnya kondisi asam di organ lambung (Casula, *et al.*, 2002; Hong, *et al.*, 2005). Bentuk spora *Bacillus* yaitu hampir bulat ellipsoid (*spheroid*) (Manetsberger, *et al.*, 2018).

Spora *Bacillus* memiliki struktur berlapis yang memberikan ketahanan terhadap lingkungan yang buruk. Jenis protein yang terdapat di dalam spora yaitu tipe  $\alpha/\beta$  kecil *acid-soluble spore protein* (SASP) yang melindungi bahan genetik dari kerusakan DNA. Inti spora mengandung *pyridine-2,6-carboxylic acid* yang juga dikenal sebagai *dipicolinic acid* (DPA). Di luar membran terdapat dinding sel germinal (korteks) yang terdiri dari peptidoglikan. Mantel spora terdiri dari protein dan glikoprotein yang bertindak sebagai filter untuk banyak molekul termasuk enzim dan nutrisi (Soni, *et al.*, 2016; Berendsen, *et al.*, 2016).

Spora bakteri terbentuk melalui beberapa tahapan yang terdiri dari tiga proses fisiologis yang berbeda yaitu pertumbuhan vegetatif, sporulasi dan germinasi (Gambar 3) (Sella, *et al.*, 2014). Terbentuknya spora diawali dengan adanya pembelahan sel asimetris dan perkembangan dari sel yang berukuran kecil (*prespore* atau *forespore*) menjadi spora dewasa (*mature spore*) (Xenopoulos dan Piggot, 2011). Pembelahan sel asimetris terjadi akibat kondisi sel bakteri yang mengalami kelaparan karena ketersediaan nutrisi yang terbatas dan diatur oleh jaringan regulasi yang kompleks sehingga menghasilkan pembentukan metabolisme yang tidak aktif secara metabolik (Karava, *et al.*, 2019). Ketika pertama kali terbentuk, *prespore* hanya mengandung 30% kromosom yang sisanya akan ditranslokasi oleh sel induk dan meninggalkan salinan kromosom lain di dalam sel induk (Wu dan Errington, 1994). Pada proses sporulasi, sel induk

(*mother cell*) memiliki peranan besar pada perkembangan spora tetapi mengalami autolisis setelah melepaskan spora ke lingkungan sekitarnya (Lewis, 2000).

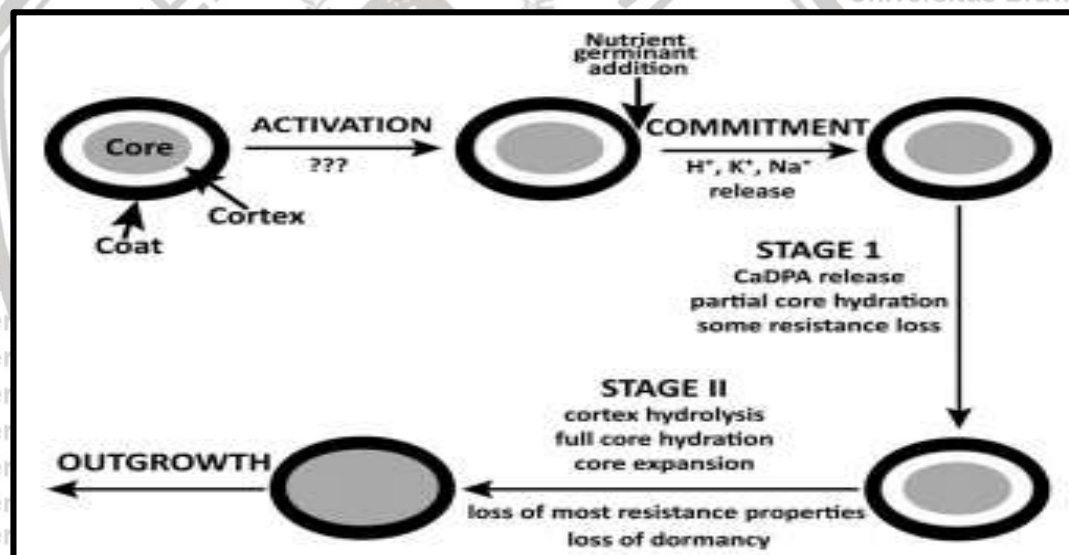
Setelah pembelahan sel asimetris, sel induk menginisiasi proses migrasi membran yang menelan calon sel spora (*prespore*) kemudian mengelilinginya dalam membran ganda yang berasal dari septum (Broder dan Pogliano, 2006; Ojic, *et al.*, 2016). Sintesis lapisan pelindung (korteks, mantel dan exosporium dalam beberapa spesies) dimulai selama pembentukan spora dan bergantung pada sel induk. Komponen struktural tersebut disintesis dalam sel induk dan kemudian hasilnya akan tersusun di sekitar spora yang terbentuk. Spora yang dilepaskan dapat bergerminasi di dalam kondisi air, nutrisi dan lingkungan yang menguntungkan. Spora yang berkecambah akan menghasilkan sel yang dapat menggandakan diri secara vegetatif dan pada akhirnya dapat bersporulasi kembali apabila kondisi lingkungan kembali tidak menguntungkan (Cutting, *et al.*, 2009).



**Gambar 3.** Skema Siklus Sporulasi Bakteri *Bacillus megaterium* (Errington, 2003)

Sporulasi melibatkan pembelahan sel asimetris dengan salinan genom yang dipecah ke masing-masing sel anak. Sel yang lebih kecil berkembang menjadi endospora yang matang dan sel induk berkontribusi pada proses

diferensiasi endospora dan kemudian autolisis melepaskan spora matang ke lingkungan (Henriques dan Moran, 2007). Spora merupakan fase dehidrasi dan jika terpapar pada konsisi nutrien yang cocok dan cukup maka spora akan berkecambah. Proses ini membutuhkan waktu yang tidak terlalu lama dimulai dengan masuknya air pada spora, mematahkan dan menghilangkan lapisan luar spora, tumbuh dan menjadi sel-sel vegetasi (Moir dan Smith, 1990). Secara singkat, tahapan germinasi spora *Bacillus* diawali dengan masuknya nutrisi ke spora kemudian akan melepaskan beberapa kation monovalent ( $H^+$ ,  $K^+$  dan  $Na^+$ ). Kemudian melepaskan CaDPA dan korteks spora mengalami hidrolisis sehingga akan membentuk sel vegetative kembali (Setlow, 2014). Proses germinasi spora *Bacillus* disajikan pada Gambar 4.



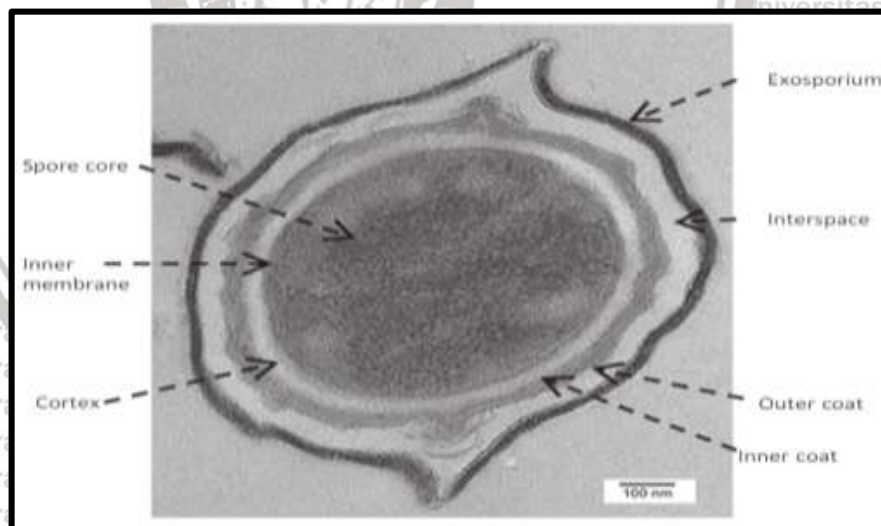
Gambar 4. Proses Germinasi Spora Bacillus (Setlow, 2014).

### 2.3 Struktur dan Kandungan Spora *B. megaterium*

Spora bakteri *B. megaterium* memiliki bentuk yang hampir bulat ellipsoid (*spheroid*) (Manetsberger, *et al.*, 2015). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Henriques dan Moran (2007) dan McKenney, *et al.* (2013) yaitu pada pengamatan spora dengan menggunakan mikroskop elektron menunjukkan bahwa struktur spora bakteri pada dasarnya terdiri dari mantel, lapisan dalam,

lapisan luar dan korteks. Spora *B. cereus* dan *B. megaterium* memiliki bagian luar yang berbeda secara morfologis dengan spora bakteri lainnya yang disebut dengan *exosporium* (Gambar 5).

Spora bakteri memiliki struktur berlapis yang memberikan ketahanan terhadap lingkungan yang buruk. Jenis protein yang terdapat di dalam spora yaitu tipe  $\alpha/\beta$  kecil *acid-soluble spore protein* (SASP) yang melindungi bahan genetik dari kerusakan DNA. Selain itu, inti spora juga mengandung *pyridine-2,6-carboxylic acid* yang juga dikenal sebagai *dipicolinic acid* (DPA). Di luar membran dalam terdapat dinding sel germinal (korteks) yang terdiri dari peptidoglikan (Setlow, 2006). Soni, *et al.* (2016) menambahkan, pada bagian mantel spora terdiri dari protein dan glikoprotein dan bertindak sebagai filter untuk banyak molekul termasuk enzim dan nutrisi. Pada bagian korteks terdapat peptidoglikan serta bagian inti terdapat ribosom, enzim, *small acid-soluble binding proteins* (SASP) untuk melindungi DNA di jaringan kromatin



**Gambar 5.** Spora *B. megaterium* dengan Menggunakan Mikroskop Elektron (McKenney, *et al.*, 2013).

Beberapa spesies *Bacillus* salah satunya *B. megaterium* pada sporanya terdapat *exosporium* akan tetapi tidak ditemukan pada *B. subtilis*. Komposisi *exosporium* pada *B. cereus* yaitu protein (43-52% dari berat kering), lipid (15-18%

dari berat kering), karbohidrat (20-22% dari berat kering) dan abu (sekitar 4%) serta mengandung kalsium dan magnesium (Matz, *et al.*, 1970; Beaman, *et al.*, 1971). *Exosporium* terdiri dari protein termasuk beberapa glikoprotein (Lai, *et al.*, 2003; Redmond, *et al.*, 2004). Pada mantel spora berada di dalam exosporium dan umumnya terdiri dari lapisan konsentris yang tipis (Driks, 1999). Spora *B. subtilis* memiliki 2 lapisan yang utama yaitu mantel spora dalam dan luar. Mantel didominasi oleh protein (50-80%) (Aronson dan Fitz-James, 1976; Pandey dan Aronson, 1979) dan juga terdapat karbohidrat (6%) (Pandey dan Aronson, 1979; Jenkinson, *et al.*, 1981). Mantel spora berperan penting untuk resistensi terhadap beberapa faktor kimia, tetapi tidak untuk panas dan radiasi (Nicholson, *et al.*, 2000). Korteks spora terdiri dari peptidoglikan (PG) yaitu sekitar 2,9% asam muramik lebih rendah jika dibandingkan dengan sel vegetatif yang mencapai 33% (Atrih dan Foster, 1999) dan terdapat molekul *piridin-2,6-dicarboxylic acid* (DPA) (Zhang, *et al.*, 2012). Inti spora berada di pusat spora yang terdiri dari RNA, ribosom dan sebagian besar enzim. Inti juga mengandung 5-15% DPA (Setlow, 2006; Sella, *et al.*, 2014). Warth, *et al.* (1963) menambahkan, spora *Bacillus subtilis* memiliki kandungan total nitrogen 9,9 %DW, Total fosfor 0,7 %DW, *hexosamine* (*glucosamine*) 7,0 %DW, *hexose* (glukosa) 0,5 %DW, *methyl pentose* (*rhamnose*) 0,75% DW. Komposisi asam amino *B. subtilis* yaitu alanin, asam glutamat, glukosamin, *hexosamine*, DAP, glisin, serin, *threonin*, valin, leusin/isoleusin, phenylalanin, tyrosin, asam aspartat, arginin, histidin dan lisin.

#### 2.4 Pengaruh Sumber dan Dosis Karbon Terhadap Produksi Spora

Ketersediaan karbon di lingkungan berperan penting untuk pembentukan spora bakteri. Karbon di lingkungan media kultur berperan sebagai faktor pembatas untuk pertumbuhan bakteri (Ekblad dan Nordgren, 2002; Andrew, *et al.*, 2012; Wambeke, *et al.*, 2018). Prinsip utama karbon sebagai faktor pembatas

terjadi ketika pertumbuhan bakteri meningkat dengan meningkatnya rasio C/N di lingkungan (Touratier, *et al.*, 1999). Setiap mikroba menggunakan bentuk karbon organik dan anorganik sebagai sumber karbon dan energi (Gougoulis, *et al.*, 2014). Berdasarkan penelitian Pinhal, *et al.* (2019), ketersediaan sumber karbon di lingkungan seperti asetat pada konsentrasi yang tinggi dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Selain itu, konsentrasi asetat yang tinggi akan berpengaruh terhadap penghambatan asimilasi karbon. Faktor utama yang mempengaruhi penghambatan pertumbuhan bakteri oleh asetat dapat berasal dari pengaruh sistemik seperti efek pelepasan asam organik atau gangguan komposisi anion sel.

Dosis karbon di lingkungan harus berada dalam kisaran optimal untuk pertumbuhan bakteri. Jumlah karbon yang berlebih di lingkungan dapat membatasi kemampuan bakteri dalam menggunakan karbon sebagai nutrisi untuk mendukung kehidupannya. Pemberian dosis karbon yang berlebih menyebabkan bakteri tidak dapat menggunakan dan mengabsorpsi semua ketersediaan karbon secara optimal (Wang, *et al.*, 2019). Bakteri membutuhkan nutrisi sebagai sumber makanan pada kehidupannya. Menurut Aislabie dan Deslippe (2013), bakteri membutuhkan karbon untuk menyusun sel dan sumber energi sedangkan nitrogen digunakan sebagai elemen asam amino dan protein. Kehidupan vegetatif sel harus dijaga di dalam kultur media dengan nutrisi yang sesuai sehingga tidak terjadi penurunan kepadatan sel vegetatif yang disebabkan oleh berkurangnya oksigen, pH, oksigen dan suhu (Surudu, *et al.*, 2015). Berdasarkan penelitian Freedman, *et al.* (2018), *B. megaterium* SR7 tumbuh pada M9 (glukosa pada dosis karbon 4 gram/liter mencapai kepadatan  $2 \times 10^7$  cfu/ml selama 12 jam jika dibandingkan dengan perlakuan kontrol glukosa yang menghasilkan kepadatan lebih tinggi yaitu  $1,5 \times 10^9$  cfu/ml. Suplementasi sumber karbon yang berbeda pada media kultur akan mempengaruhi pertumbuhan bakteri yang dihasilkan (Fonte, *et al.*, 2013).

Selain itu, konsentrasi ketersediaan karbon di lingkungan kultur dapat memberikan



pengaruh metabolisme karbon yang berbeda yang berhubungan dengan pertumbuhan bakteri (Kaur dan Tiwari, 2017).

## 2.5 Pengaruh Suhu dan pH Terhadap Produksi Spora

Sel vegetatif yang telah bertransisi menjadi spora mempunyai daya tahan yang tinggi terhadap panas dan bersifat lebih baik daripada sel vegetative (Kort, *et al.*, 2005). Sporulasi merupakan suatu proses perubahan sel vegetatif menjadi

spora yang disebabkan karena nutrisi di lingkungan kultur mulai menurun (Gray, *et al.*, 2019). Selain itu, terjadinya proses sporulasi juga disebabkan karena kondisi

stres terhadap suhu di lingkungan yang ekstrim yang dapat mengganggu metabolisme sel vegetatif (Munna, *et al.*, 2015). Suhu berperan penting dalam

pertumbuhan bakteri dan pembentukan spora (Rey, *et al.*, 1975). Spora yang memiliki resistensi terhadap panas ditentukan oleh kondisi lingkungan hidup

mikroorganisme selama proses sporulasi (Cook dan Gilbert, 1968; Mayou dan Jezeski, 1977). Setiap spesies *Bacillus* mempunyai kisaran suhu yang berbeda-

beda untuk bersporulasi (Condon, *et al.*, 1992). Menurut Lindsay, *et al.*, (1999), *B. subtilis* dapat bersporulasi pada rentang suhu yang luas yaitu 20-50 °C. Bakteri *B.*

*coagulans* dapat bersporulasi pada suhu 35-50°C (Fernandez-Coll dan Rodriguez Toro, 1986), *B. licheniformis* STCC 4523 bersporulasi pada suhu 30-52 °C (Raso,

*et al.*, 1995) dan *B. psycirossacalii-olyticus* ATCC 2329 bersporulasi pada suhu 5-20 °C (Michels dan Visser, 1976), Berdasarkan studi penelitian terdahulu tersebut

dapat disimpulkan bahwa bakteri yang termasuk ke dalam genus *Bacillus* mampu bersporulasi pada rentang suhu 5-52°C bergantung pada spesies dan strain bakteri

yang digunakan.

Produksi spora *Bacillus megaterium* dapat dipengaruhi oleh kondisi pH di lingkungan kultur. Derajat asam basa pada lingkungan kultur akan mempengaruhi pertumbuhan bakteri dan proses terbentuknya spora (Tirloni, *et al.*, 2017). pH pada

kehidupan sel suatu mikroorganisme berperan penting di dalam reaksi kimia.

Banyak enzim intraseluler menunjukkan aktivitas dan stabilitas yang optimal ketika

pH mendekati netral (Beilen dan Brul, 2013). Sporulasi *B. subtilis* terjadi pada pH

6-8, akan tetapi di bawah pH 6 produksi spora mengalami penurunan (Dawes dan

Mandelstam, 1970). Pengaruh pH terhadap sporulasi sering dihubungkan dengan

dosis karbon dan suhu pada lingkungan kultur. Berdasarkan penelitian Powell

(1951), sporulasi *B. megaterium* setelah 8 hari pada suhu 35 °C dengan

konsentrasi glukosa yaitu 6 mM pada pH 8,1 – 8,2 menunjukkan proses sporulasi

yang sempurna, akan tetapi pada dosis glukosa 12 mM dan 25 mM pada pH 8,1 –

8,2 tidak menunjukkan adanya proses sporulasi. Monteiro, *et al.* (2005)

menambahkan, setiap fase pertumbuhan bakteri hingga proses sporulasi memiliki

nilai pH yang berbeda-beda. Fase eksponensial menunjukkan pH menurun dari

6,7 hingga 6,5. Kemudian setelah mengalami awal proses dari sporulasi

mengakibatkan pH meningkat dari 6,5 sampai 9,0. Pada saat pH 9, konsentrasi

spora mencapai puncak tertinggi yaitu  $4,2 \times 10^8$  spora/ml. Hasil sporulasi *Bacillus*

lain seperti *B. cereus* strain ATCC 7004 memproduksi spora  $1,6 \times 10^{10}$  spora/ml

pada pH 7,0–7,2, akan tetapi strain *Bacillus cereus* strain ATCC 4342

memproduksi spora  $2,0 \times 10^{10}$  spora/ml pada pH 6,2–6,5. (Mazas, *et al.*, 1997). *B.*

*subtilis* var. *niger* menghasilkan spora  $1,1 \times 10^8$  dan  $9,2 \times 10^7$  pada *B. cereus* pada

pH 7, sedangkan *B. stearothermophilus* ( $2,4 \times 10^7$ ) pada pH 8,7 (Yazdany dan

Laskhari, 1975). Kondisi ini menunjukkan bahwa setiap strain *Bacillus*

mempunyai kebutuhan pH yang berbeda-beda dalam proses sporulasi.

## 2.6 Probiotik dan Mekanismenya

Probiotik merupakan mikroorganisme hidup yang memiliki pengaruh

menguntungkan bagi kesehatan inang dengan cara meningkatkan keseimbangan

mikroba di usus (Neha, *et al.*, 2012). Salah satu spesies yang dapat digunakan

sebagai probiotik yaitu *B. megaterium* (Nakayama, *et al.*, 2009; Andriani, *et al.*, 2017). Beberapa penelitian yang telah dilakukan mengenai pemanfaatan probiotik *Bacillus* yaitu dapat meningkatkan imunitas dan resistensi udang vaname terhadap *white spot syndrome virus* (WSSV) (Liu, *et al.*, 2010), meningkatkan aktivitas enzim protease dan amilase serta *specific growth rate* (SGR) ikan lele (Afrilasari, *et al.*, 2016) dan menurunkan kadar amonia, *total suspended solid* dan *total dissolved solid* (TDS) pada sistem polikultur (Hura, *et al.*, 2018).

Menurut Konuray dan Erginkaya (2018), berdasarkan bentuknya, mikroorganisme probiotik dapat dibedakan menjadi dua yaitu bentuk spora dan vegetatif. Umumnya mikroorganisme yang digunakan sebagai probiotik yaitu dalam bentuk sel vegetatif (Ozusaglam, *et al.*, 2010). Kelemahan sel vegetatif yang telah diteliti yaitu pengaruh suhu ekstrim dan pH asam (lambung) dapat membahayakan kehidupan sel vegetatif (Cebrian, *et al.*, 2017), terganggunya kehidupan sel vegetatif pada saluran pencernaan organisme karena oksigen terbatas, pH rendah dan garam empedu (Bernardeau, *et al.*, 2017) serta mengalami stres pada nutrisi yang terbatas (Terpou, *et al.*, 2019).

Menurut Salminen, *et al.* (2004), terdapat beberapa genus bakteri yang umumnya dapat digunakan sebagai probiotik dalam kegiatan budidaya ikan yaitu sebagai berikut:

#### 1. Lactobacillus

Studi tentang Lactobacillus yang memiliki habitat pada kulit, insang dan usus ikan pertama kali dilaporkan oleh Dyer pada tahun 1947 dalam sebuah studi tentang ikan cod Atlantik (*Gadus morhua* L.). Setelah itu, sekitar empat belas tahun kemudian, ditemukan Lactobacillus dari ikan hering (*Clupea harengus* L.). Selanjutnya diketahui bahwa genus Lactobacillus ditemukan pada beberapa golongan ikan seperti Cyprinidae, Escocidae, dan Percidae pada fase larva, benih, dan juvenil.

## 2. Carnobacteria

Penelitian pertama yang menunjukkan adanya strain *Carnobacterium* pada ikan yaitu di dominasi hidup di saluran pencernaan. Umumnya ditemukan pada bagian usus kecil dan besar dari salmon Atlantik pada fase juvenil, dan ditemukan juga pada cod Atlantik pada fase juvenil atau fase dewasa.

## 3. Aerococcus

Strain *Aerococcus* jarang ditemukan di hewan air, dan hanya satu penelitian yang melaporkan keberadaannya dalam usus ikan yaitu pada ikan jenis salmon Atlantik.

## 4. Enterococcus

Bakteri dari genus *Enterococcus* sering ditemukan di ikan mas (*Cyprinus carpio*) dan lobster air tawar (*Macrobrachium rosenbergii*) khususnya pada bagian saluran pencernaan (usus).

## 5. Lactococcus

Strain *Lactococcus* ditemukan dan diisolasi dari beberapa hewan air.

## 6. Leuconostoc

Bakteri dari genus *Leuconostoc* ditemukan pada usus ikan Char Arktik.

## 7. Pediococcus

Strain *Pediococcus acidilactici* telah ditemukan dan diisolasi pada ikan. Spesies bakteri yang termasuk ke dalam genus ini menunjukkan adanya beberapa sifat probiotik meliputi produksi bakteriosin dan strain ini dikombinasikan dengan *Saccharomyces cerevisiae* untuk proses pengayaan dari zooplankton nauplii Artemia.

## 8. Streptococcus

Bakteri dari genus *Streptococcus* pada awalnya ditunjukkan sebagai bagian dari mikrobiota usus pada ikan. Selama proses perkembangannya, genus

dari bakteri ini telah ditemukan di lambung, usus kecil, dan usus besar dari beberapa spesies ikan dan udang.

#### 9. *Vagococcus*

Genus bakteri ini ditemukan dan telah diisolasi dari ikan trout coklat.

Beberapa genus bakteri yang dapat digunakan sebagai probiotik dan diisolasi pada saluran pencernaan ikan nila meliputi *Lactobacillus*, *Enterococcus*,

*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptococcus* dan *Leuconostoc* (Reda, et al., 2017). Hai

(2015) menambahkan, *Bacillus licheniformis*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus*

*pumilus*, *Lactobacillus lactis* dan *Bacillus subtilis* diisolasi dari ikan Rainbow trout

dan *Mugil cephalus* mempunyai potensi yang besar untuk digunakan sebagai

probiotik. Probiotik pada industri akuakultur merupakan alternatif untuk mencegah

penyakit ikan daripada menggunakan antibiotik karena lebih ramah lingkungan

(Shefat, 2018).

Penggunaan *Streptomyces* sebagai probiotik dalam industri akuakultur

dapat berfungsi dalam menjaga organisme budidaya dari serangan patogen yang

dapat dilakukan dengan memproduksi metabolit sekunder seperti salah satunya

yaitu anti-*quorum sensing* untuk melawan bakteri *Vibrio*. Mekanisme probiotik dari

genus ini yaitu dapat memproduksi siderofor untuk menghambat pertumbuhan

patogen. Selain itu, senyawa anti-virus juga dihasilkan oleh probiotik *Streptomyces*

dapat mencegah serangan infeksi virus *white spot syndrome virus* (WSSV).

Probiotik ini dapat mengurangi konsentrasi amonia dan nitrit yang bersifat racun di

lingkungan perairan. Di sisi lain, probiotik *Streptomyces* dapat meningkatkan

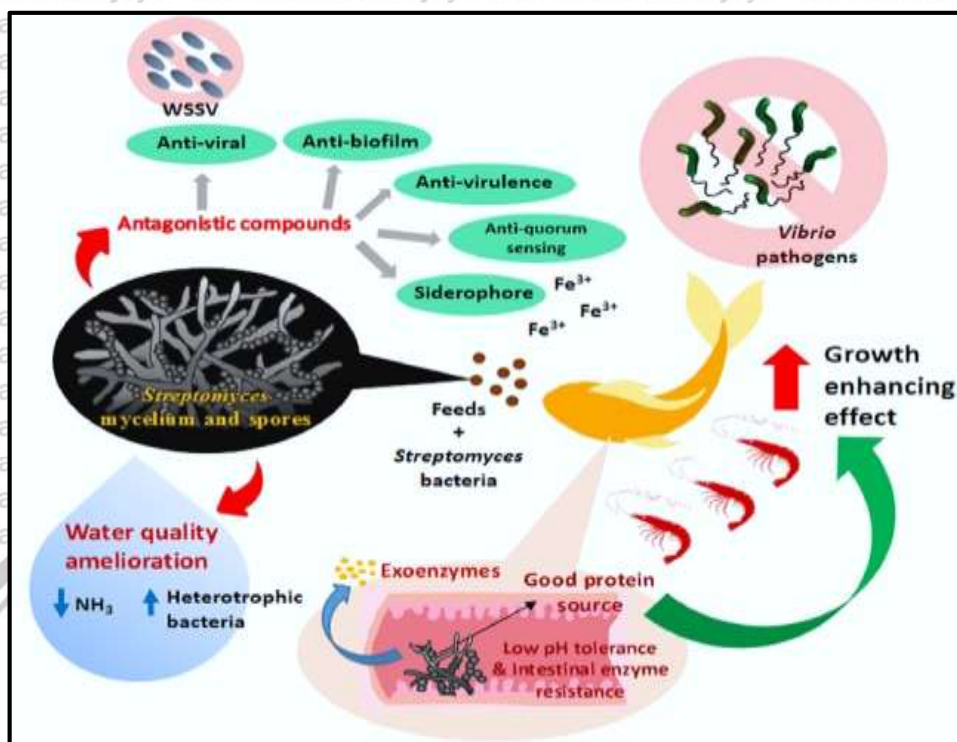
pertumbuhan organisme budidaya melalui penyediaan sumber protein yang baik.

Eksoenzim hidrolitik yang dikeluarkan oleh *Streptomyces* dapat meningkatkan laju

aktivitas amilolitik dan proteolitik dalam saluran pencernaan organisme budidaya.

Sehingga efisiensi penggunaan pakan menjadi lebih efisien yang berdampak pada

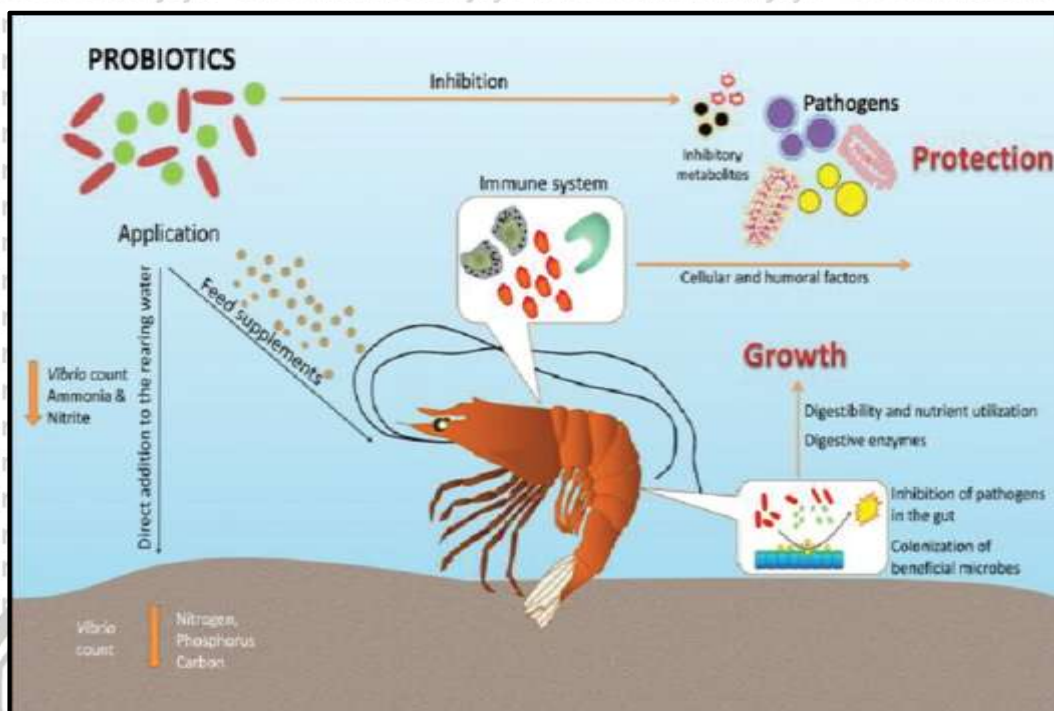
rendahnya FCR yang dihasilkan. Mekanisme kerja probiotik pada kegiatan budidaya disajikan pada Gambar 6 (Loh, et al., 2016).



**Gambar 6.** Mekanisme Kerja Probiotik Bakteri *Streptomyces* dan Aplikasinya dalam Akuakultur (Loh et al., 2016).

Implementasi probiotik pada industri akuakultur dapat digunakan sebagai penyedia makanan hidup untuk meningkatkan kualitas air dan respon imun suatu organisme budidaya. Bakteri yang dapat digunakan sebagai kandidat probiotik dapat diisolasi melalui berbagai macam sumber seperti saluran pencernaan, lendir ikan dan sedimen perairan. Beberapa agen bakteri gram positif seperti *Bacillus* sp. dapat mengubah bahan organik baik yang bersifat terlarut dan partikulat yang beracun pada media pemeliharaan ikan dapat menjadi menguntungkan bagi ikan dan fitoplankton. Aplikasi probiotik pada kegiatan budidaya dapat ditambahkan ke inang atau lingkungan sekitarnya dalam beberapa cara, seperti: (i) Penambahan pada pakan buatan, (ii) penambahan ke media budidaya ikan atau udang, (iii) perendaman, dan (iv) penambahan melalui pakan alami melalui proses

bioenkapsulasi (Jamal *et al.*, 2019). Mekanisme fungsi probiotik pada kegiatan budidaya udang disajikan pada Gambar 7.



Gambar 7. Mekanisme Fungsi Probiotik pada Budidaya Udang (Jamal *et al.*, 2019)

## 2.7 Spora *Bacillus* sebagai Probiotik

Probiotik spora *Bacillus spp.* (*Bacillus subtilis*, *B. Clausii*, *B. Cereus*, *B.*

*Coagulans* dan *B. Licheniformis*) memiliki beberapa keuntungan jika dibandingkan dengan bakteri yang berbentuk non-spora (contohnya *Lactobacillus spp.*). Menurut

Cutting (2011) : (i) spora dapat disimpan pada suhu ruangan dan dalam bentuk desikasi tanpa ada pengaruhnya pada viabilitasnya, dan (ii) spora mampu

bertahan hidup pada pH rendah dalam *gastric barrier*. Studi pemanfaatan spora bakteri sebagai probiotik dalam kegiatan budidaya perikanan beberapa tahun

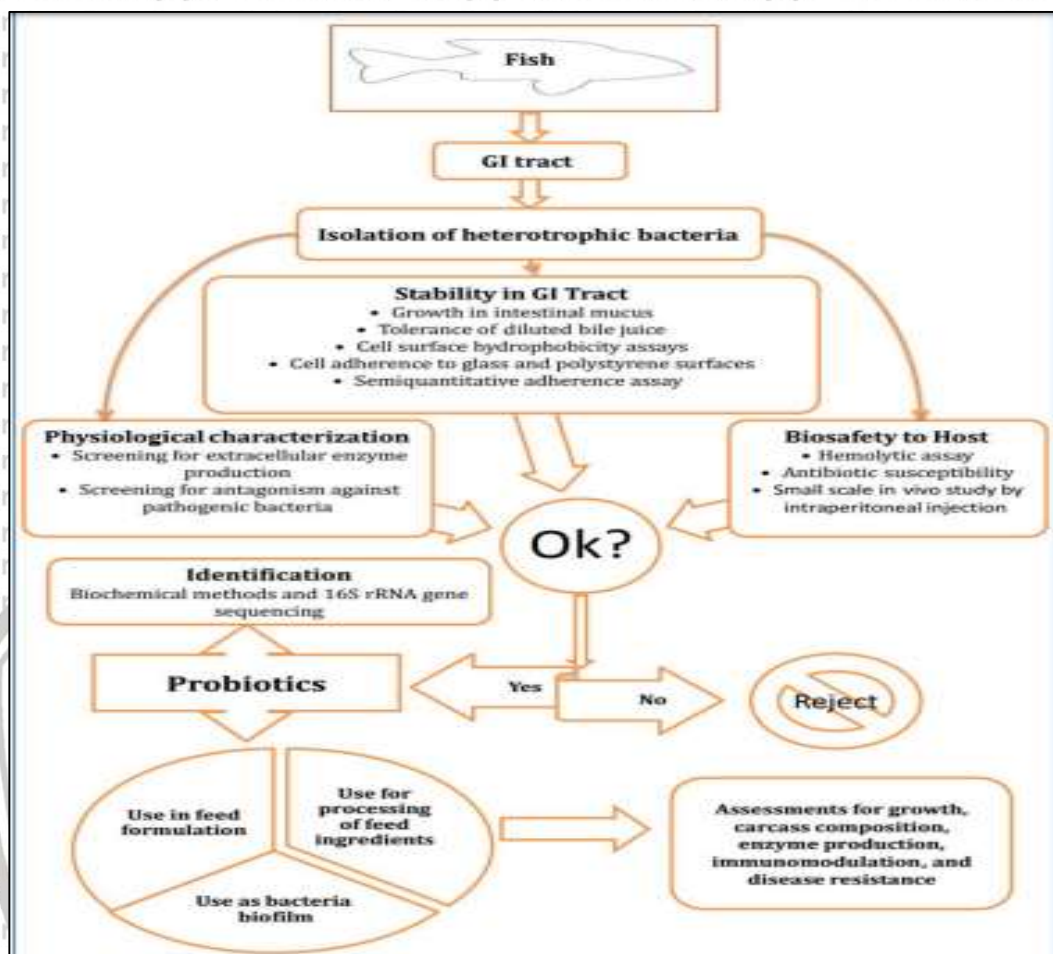
belakangan ini mulai dikembangkan. Pemanfaatan spora sebagai kandidat probiotik harus dilakukan beberapa tahapan seleksi bakteri pembentuk endo-

spora agar memenuhi standar sebagai kandidat probiotik. Setelah bakteri pembentuk spora diisolasi, kemudian dilakukan identifikasi dan karakterisasi

fenotip, kemampuan produksi enzim, analisis total asam lemak secara seluler dan

pengujian 16S rDNA serta identifikasi secara filogenetik (Bayane, *et al.*, 2010).

Tahapan seleksi probiotik secara sistematis disajikan pada Gambar 8.

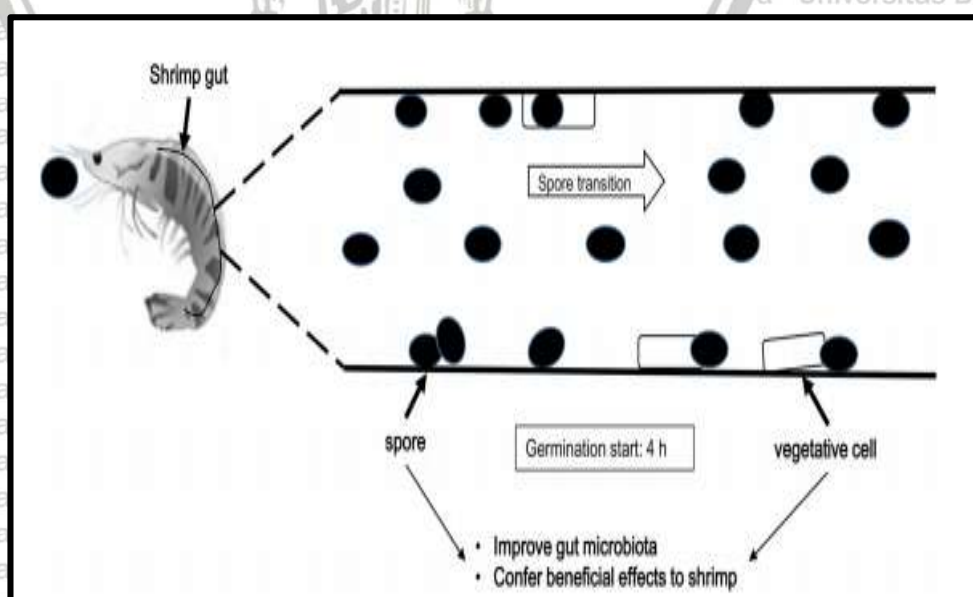


**Gambar 8.** Skema Seleksi Mikroorganisme sebagai Kandidat Probiotik (Ghosh dan Ray, 2017).

Aplikasi spora *B. velezensis* AP193 yang ditambahkan ke pakan ikan dengan dosis 8% (v/w) (konsentrasi akhir  $4 \times 10^7$  CFU/g pakan) menunjukkan tingginya rata-rata berat ikan *Ictalurus punctatus* sebesar 40,08 gram jika dibandingkan dengan perlakuan kontrol atau tanpa pemberian spora (28,55 gram) selama 10 minggu pemeliharaan (Garcia-Marengoni, *et al.*, 2015). Mekanisme spora *Bacillus* sebagai probiotik yaitu adanya kemampuan spora dalam berkecambah di saluran pencernaan ikan (Gambar 9). Spora akan berkecambah dengan adanya nutrisi dan kondisi lingkungan yang menguntungkan (Swick, *et al.*, 2016). Ketersediaan nutrisi akan mengaktifkan reseptor yang terlibat dalam proses



perkecambahan sehingga menyebabkan terjadinya pelepasan ion  $\text{Ca}^{2+}$  dan DPA (*dipicolinic acid*) dari inti spora. Reseptor yang terikat terletak di membran akan memicu terjadinya pelepasan DPA dan memungkinkan air masuk ke inti spora. Hidrasi ini mengaktifkan enzim spora yang menghidrolisis korteks spora untuk memulai proses perkecambahan. Hidrolisis korteks dan pelebaran korteks selanjutnya memungkinkan hidrasi penuh dari inti spora. Selama proses perkecambahan, DPA dilepaskan secara cepat. Selain itu,  $\text{Ca}^{2+}$  dan DPA yang dilepaskan dari satu spora dapat merangsang perkecambahan spora lainnya (Setlow, 2003). Spora dalam pakan berkecambah dan menjadi aktif secara metabolik dalam saluran pencernaan untuk mengeluarkan enzim pencernaan (Bernardeau, *et al.*, 2017). Pada aplikasi spora yang diberikan ke pakan udang menunjukkan bahwa sebagian besar spora akan melewati saluran pencernaan dalam waktu yang cepat. Sedangkan beberapa spora akan terakumulasi di epitelium dan selanjutnya terjadi proses germinasi menjadi sel vegetatif setelah 4 jam pemberian pakan. Spora yang telah berkolonisasi memiliki peranan penting untuk meningkatkan jumlah mikrobiota di usus dan memberikan keuntungan pada inang (Nguyen, *et al.*, 2018).



**Gambar 9.** Model Spora di Saluran Pencernaan Udang (Nguyen, *et al.*, 2018)

## 2.8 Media Tumbuh Alternatif Spora *Bacillus*

Perkembangan penggunaan media alternatif dengan biaya yang murah untuk produksi spora terus dilakukan yang dapat bersumber dari limbah buangan industri dan produk agrikultur (Robl, *et al.*, 2009; Ernandes, *et al.*, 2013). Produk pertanian dapat dijadikan alternatif substrat untuk sporulasi bakteri karena memiliki ketersediaan karbon organik yang mencukupi untuk kehidupan bakteri. Produk pertanian dengan harga murah yang dapat digunakan sebagai substrat karbon yaitu ubi jalar (*Impomoea batasil*), akar singkong (*Manihot esculenta*), beras (*Oryza sativa*) dan beras ketan (*Oryza sativa* var. *glutinosa*). Hasil penelitian menunjukkan bahwa keempat substrat dari produk pertanian tersebut dapat mendukung produksi spora *Bacillus* KKU02 dan *Bacillus* KKU03 dengan hasil yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan perlakuan kontrol *nutrient broth*. Perlakuan dengan penggunaan akar singkong dan ubi jalar memiliki produksi spora *Bacillus* KKU02 dan *Bacillus* KKU03 tertinggi secara berturut-turut yaitu  $1,62 \times 10^8$  dan  $6,61 \times 10^6$  spora/ml (Wangka-Orm, *et al.*, 2014).

Penelitian lainnya menggunakan tiga produk sampingan dari kegiatan industri sebagai media produksi spora *Bacillus* yaitu campuran molase dan kedelai, sukrosa dengan media keju whey dan media limbah industri jagung. Hasil kepadatan spora dari ketiga produk sampingan industri tersebut dengan molase dan tepung kedelai menghasilkan produksi spora tertinggi yaitu  $5,9 \times 10^8$  spora/ml (Salazar-Magallon, *et al.*, 2015). Media alternatif lain yang dapat digunakan untuk produksi spora juga telah diteliti oleh Gopinathan, *et al.* (2016), penggunaan sumber karbon (tebu) dan sumber nitrogen (bubuk kedelai) dapat digunakan secara efektif dengan biaya yang lebih murah jika dibandingkan dengan sukrosa dan glukosa sebagai komponen media untuk produksi spora bakteri *Bacillus thuringiensis*.

## 2.9 Kepadatan Vegetatif dan Kepadatan Spora

Kepadatan sel vegetatif di lingkungan dipengaruhi oleh ketersediaan karbon.

Tingginya dosis karbon yang diberikan, menyebabkan tingginya produksi sel vegetatif di media tumbuh. Berdasarkan penelitian Yuksekdag and Aslim (2008), tingginya konsentrasi karbon di lingkungan mengindikasikan bahwa tingginya pertumbuhan *Lactobacillus delbrueckii* and *Streptococcus thermophilus*. Karbon berperan penting di dalam menyediakan sumber energi khususnya untuk bakteri heterotrofik (Escobar, *et al.*, 2001). Menurut Hassan, *et al.* (2014), ketersediaan sumber karbon di lingkungan mempengaruhi pertumbuhan sel dan produksi asam laktat. Seleksi media kultur merupakan indikator yang sangat penting untuk pertumbuhan sel yang bergantung pada kebutuhan nutrisi mikroorganisme (Basu, *et al.*, 2015).

Kepadatan spora di media umumnya terbentuk ketika terjadi penurunan sel vegetatif. Kepadatan spora tersebut akan terus meningkat sejalan dengan kepadatan sel vegetatif yang semakin menurun (Ubong, *et al.*, 2019). Konsentrasi sumber karbon merupakan faktor utama dalam pembentukan spora (Yuniarti, *et al.*, 2019). Konsentrasi karbon harus berada dalam kondisi optimal, karena jika berlebih karbon dapat menghambat produksi spora dari suatu bakteri (Posada-Urbe *et al.*, 2015). Tingginya dosis karbon di lingkungan kultur dapat menghambat produksi enzim yang terlibat dalam proses sporulasi (Monteiro, *et al.*, 2014). Kondisi ini mengindikasikan bahwa ketersediaan dosis karbon di lingkungan harus menyesuaikan strain bakteri yang digunakan.

## 2.10 Efisiensi Sporulasi

Efisiensi sporulasi merupakan perbandingan antara kepadatan maksimum sel vegetatif dengan spora. Menurut Uono, *et al.* (2019), peningkatan efisiensi sporulasi *B. coagulans* dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu karbohidrat, garam

mineral, pH di kultur media. Selain itu, konsentrasi glukosa sebagai sumber karbon sebaiknya dikurangi jumlahnya karena dapat mengurangi hasil efisiensi sporulasi (Monteiro, *et al.*, 2014). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa kadar glukosa yang rendah (2 gram/liter) dapat meningkatkan produksi spora yaitu  $0,51 \times 10^9$  cfu/ml dan  $1,87 \times 10^9$  cfu/ml dengan efisiensi sporulasi 50,7% dan 93,2% (Posada-Urbe, *et al.*, 2015).

Efisiensi sporulasi yang tinggi dapat diinisiasi dengan pembentukan spora yang banyak dari kepadatan sel vegetatif tertinggi. Penambahan mineral ke dalam media kultur merupakan salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk meningkatkan efisiensi sporulasi. Penambahan konsentrasi kalsium sebanyak 0,5 sampai 2 mM dapat meningkatkan kepadatan *B. licheniformis* mencapai 9,15 – 9,24 log cfu/ml (Sinnela, *et al.*, 2019). Penelitian lain menunjukkan bahwa sumber karbon berupa asetat dengan konsentrasi kurang dari 0,04% dapat meningkatkan efisiensi sporulasi (Taxis, *et al.*, 2005).

### 2.11 Laju Pertumbuhan dan Waktu Generasi

Laju pertumbuhan bakteri secara umum mempengaruhi fisika kimia dari sel bakteri. Pertumbuhan eksponensial yang didapat menyebabkan sel harus berada pada kondisi replikasi, pembelahan fisika dan biomassa bakteri yang konstan untuk mendapatkan laju pertumbuhan yang diinginkan (Hagen, 2010). Laju pertumbuhan bakteri dipengaruhi oleh nutrisi khususnya ketersediaan karbon (glukosa, fosfat atau triptopan) (Shehata dan Marr, 1971). Selain itu, suhu juga mengontrol perkembangan populasi mikroba yang berhubungan dengan laju pertumbuhan dan waktu generasi (Ratkowsky, *et al.*, 1982). Kondisi pH di lingkungan juga berdampak terhadap laju pertumbuhan bakteri. Menurut Leroi, *et al.* (2012), *Brochothrix thermosphacta* dapat tumbuh dengan baik hingga pH 4,8.

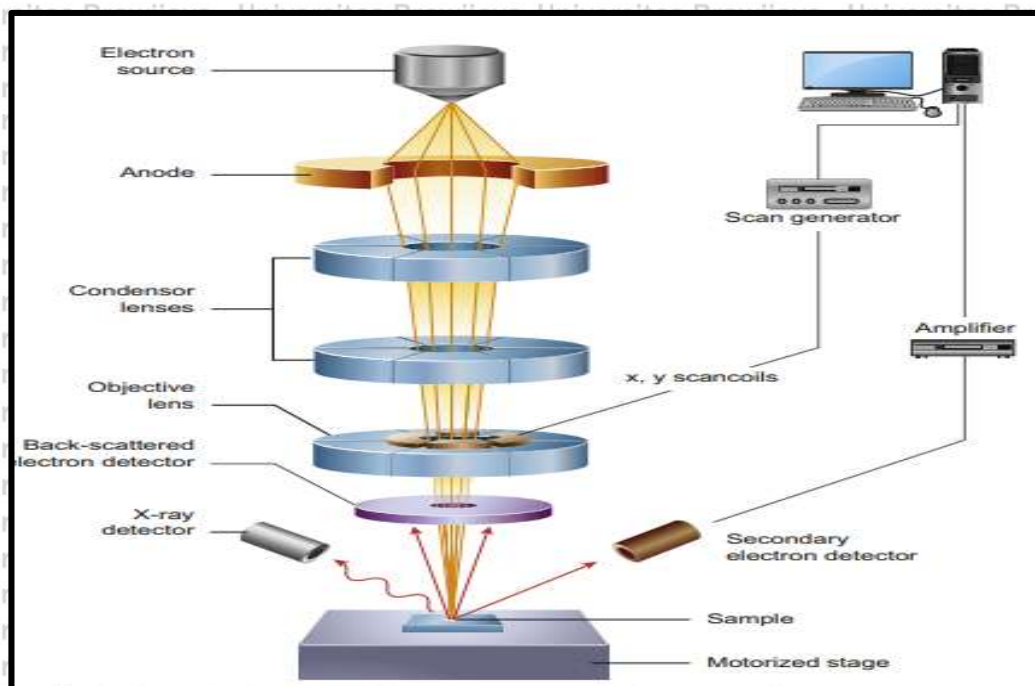
Akan tetapi berbeda dengan *Vibrio alginolyticus* yang mengalami penghambatan

pertumbuhan pada kondisi pH 3 dan 4 (Kurniawan, *et al.*, 2018). Laju pertumbuhan yang rendah dapat disebabkan karena adanya proses penyesuaian reaksi enzimatik dan metabolisme untuk beradaptasi dengan kondisi asam dalam media kultur (Farid dan Larsen, 1981).

Waktu generasi merupakan waktu yang dibutuhkan oleh sel bakteri untuk membelah dalam mencapai populasi tertinggi (Painter, 1975; Soro-Yao, *et al.*, 2014). Pengaruh iradiasi cenderung akan meningkatkan waktu generasi yang dihasilkan oleh suatu bakteri. Waktu generasi dapat dihitung dengan mengambil bagian pertumbuhan yang menunjukkan paling curam dari suatu kurva pertumbuhan yang dapat diamati melalui nilai absorbansi pada waktu pengamatan tertentu (Venugopal dan Dickson, 1999). Setiap bakteri dengan isolasi dan strain di tempat yang berbeda akan menghasilkan waktu generasi bakteri yang berbeda-beda (Koseki dan Itoh, 2001).

## **2.12 Pengamatan Morfologi Spora melalui *Scanning Electron Microscopy* (SEM)**

Perkembangan teknologi SEM secara komersil dimulai pada tahun 1965 dan terjadi peningkatan penggunaan peralatan ini sebagai alat penelitian (Collect, 1970). SEM merupakan teknik pilihan untuk menganalisis suatu permukaan spesimen seperti misalnya mikroorganisme bakteri dan jamur (Garland, *et al.*, 1979). Tata letak SEM yang terdiri dari beberapa komponen meliputi elektron gun (sumber elektron dan anoda), lensa elektromagnetik yang berfungsi untuk memfokuskan elektron, ruang hampa berfungsi untuk menampung spesimen dan terdapat sejumlah detektor yang berfungsi untuk mengumpulkan sinyal yang dipancarkan dari spesimen (Inkson, 2016). Diagram skematik komponen dari mikroskop SEM disajikan pada Gambar 10.



**Gambar 10.** Diagram Skematik Komponen Inti dari SEM (Inkson, 2016).

Penggunaan SEM pada bidang penelitian dapat mengamati bentuk tiga dimensi dari bakteri. Teknologi ini terus mengalami perkembangan hingga mengamati permukaan dari spora bakteri (Umeda dan Amako, 1980). Beberapa permukaan spora telah diamati pada berbagai bakteri seperti *B. polymyxa* (Murphy dan Campbell, 1969), *B. subtilis* (Ulrich, *et al.*, 2018) dan *B. thuringiensis* (Mukhija dan Khanna, 2018). Spora *Bacillus* yang telah diamati melalui SEM disajikan pada Gambar 11.



**Gambar 11.** Spora *B. subtilis* dengan Perlakuan DMSO yang Diamati dengan SEM (Lawrence, *et al.*, 2009).

### 3. KERANGKA KONSEP PENELITIAN

#### 3.1 Landasan Teori

Salah satu upaya yang dilakukan untuk mengatasi permasalahan probiotik yang masih menggunakan mikroorganisme dalam bentuk sel vegetatif yaitu dengan memanfaatkan spora untuk dijadikan sebagai probiotik. Menurut Soni, *et al.* (2016), spora merupakan bentuk dorman bakteri sebagai sebuah respon terhadap kondisi lingkungan yang merugikan (pH, nutrisi yang terbatas, desikasi dan suhu). Poehlein, *et al.* (2013) menambahkan, beberapa bakteri gram positif (filum Firmicutes, kelas Bacilli dan Clostridia) dan bakteri gram negatif (*Sporomusa ovata*, filum Firmicutes, kelas Negativicutes) merupakan golongan bakteri yang dapat memproduksi spora. Pemanfaatan spora bakteri sebagai probiotik mulai dikembangkan dalam beberapa tahun terakhir. Hasil beberapa penelitian menunjukkan bahwa penambahan spora *Bacillus* ke pakan dapat meningkatkan pertumbuhan ikan *Seriola quinqueradiata* (Kozasa, *et al.*, 1986), pertumbuhan larva ikan turbot (Verschuere, *et al.*, 2000) dan pertumbuhan udang galah (Wangka-Orm, *et al.*, 2014). Selain kemampuan spora yang resisten terhadap perubahan lingkungan, daya simpan spora mencapai ratusan tahun merupakan indikator untuk menggunakan spora sebagai probiotik (Vreeland, *et al.*, 2000).

Mekanisme probiotik dalam bentuk spora yaitu adanya kemampuan bergerminasi ketika tersedianya nutrisi. Nutrisi yang dibutuhkan yaitu tersedianya sumber karbon (seperti fruktosa) dan *L-alanin* yang hanya terdapat pada usus kecil suatu organisme (Moir dan Smith, 1990; Casula dan Cutting, 2002). Selain itu, spora yang masuk ke dalam usus kecil dengan kepadatan yang tinggi dapat berinteraksi dengan jaringan limfoid yang berhubungan dengan saluran pencernaan (GALT) yang akan menstimulasi sistem imun untuk mekanisme probiotik (Hong, *et al.*, 2005). Kemampuan spora dalam bertahan hidup pada

kondisi asam di lambung, sehingga nantinya akan mencapai saluran pencernaan organisme dan memberikan pengaruh yang menguntungkan melalui sekresi zat aktif (La Ragione, *et al.*, 2001; Barbosa, *et al.*, 2005).

Produksi spora *B. megaterium* sebagai kandidat probiotik dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu adanya pengaruh media dan lingkungan (Purnawati, *et al.*, 2014). Komponen nutrisi yang diperlukan pada media tumbuh spora *Bacillus* yaitu sumber karbon, garam mineral dan sumber nitrogen (Amin, *et al.*, 2008; Sarrafzadeh, 2012; Berikashvili, *et al.*, 2017). Komposisi media tumbuh yang optimal menjadi indikator penting untuk mendapatkan produksi spora yang tinggi. (Sarrafzadeh, 2012; Awad, *et al.*, 2015). Beberapa faktor yang dievaluasi untuk mendapatkan media tumbuh yang optimal yaitu kandungan karbon dan nitrogen dari media (Mishra, *et al.*, 2016), rasio C/N (Santos-Villalobos, *et al.*, 2012; Dinarvand, *et al.*, 2013), dosis karbon (Gao and Liu, 2009) serta faktor lingkungan (suhu dan pH) (Baril, *et al.*, 2012; Trunet, *et al.*, 2015).

Penelitian mengenai pemanfaatan sumber nitrogen dan mineral telah banyak dilakukan, akan tetapi ketersediaan sumber karbon sebagai faktor pembatas dalam menyeimbangkan rasio C:N menjadi sangat penting untuk diperhatikan. Selain itu, ketersediaan sumber karbon yang umum digunakan dalam memproduksi spora yaitu glukosa dan laktat yang apabila diberikan dengan dosis karbon berlebih dapat meningkatkan keseluruhan biaya operasional (de Vries, *et al.*, 2005; Tyagi dan Suresh, 2016). Perkembangan media tumbuh spora mulai menggunakan bahan yang memiliki biaya operasional yang murah dan mudah didapat. Penggunaan media biakan spora yang berasal dari produk pertanian terus dikembangkan (Chen, *et al.*, 2010).

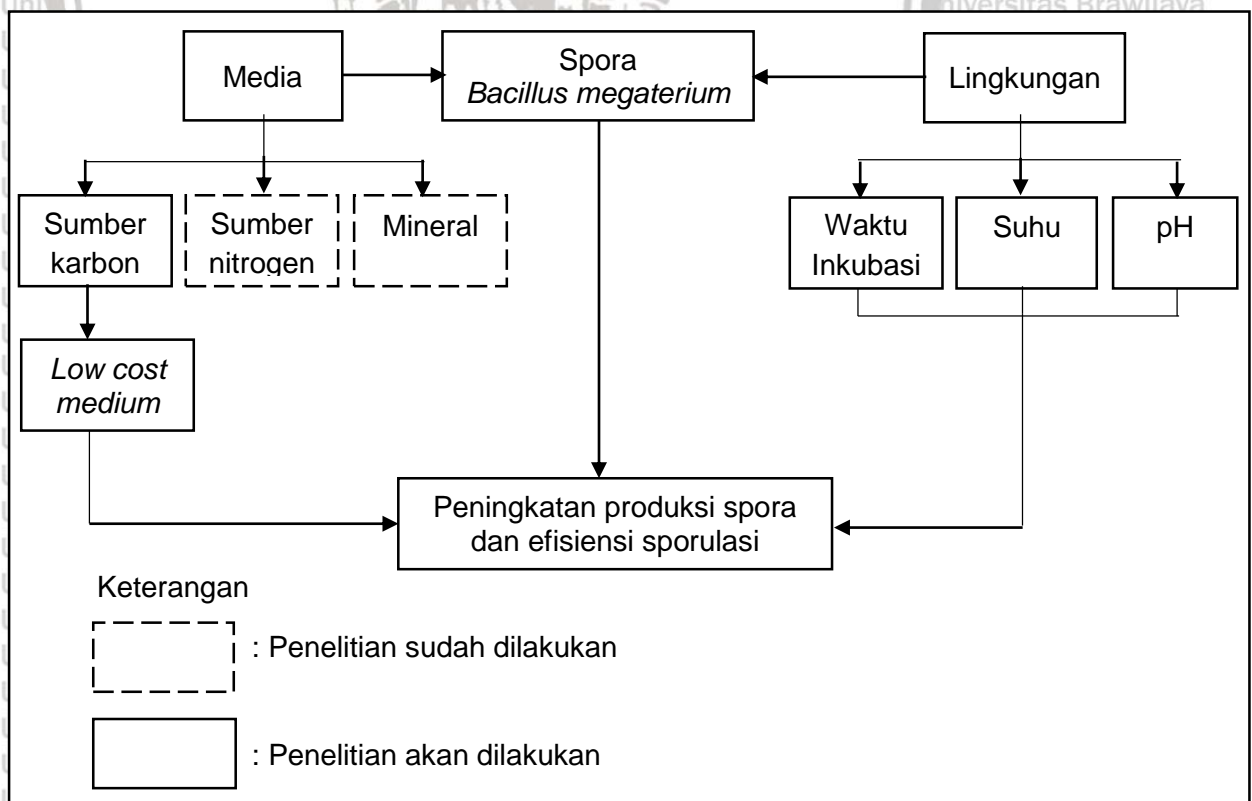
Selain faktor media, faktor lingkungan merupakan faktor penting yang harus diperhatikan. Beberapa faktor lingkungan yang mempengaruhi pertumbuhan spora yaitu waktu inkubasi, suhu dan pH. Berdasarkan studi peneltian



sebelumnya, perlakuan suhu tinggi yang diberikan dengan waktu inkubasi yang berbeda dapat mempengaruhi ketahanan panas dari spora (Sang-Wook dan Sim, 2006) serta kelangsungan hidup spora (Prentice dan Clegg, 1974). Perbedaan pH pada media kultur juga mempengaruhi proses sporulasi dan efisiensi sporulasi yang dihasilkan dengan waktu inkubasi yang berbeda (Monteiro, *et al.*, 2005).

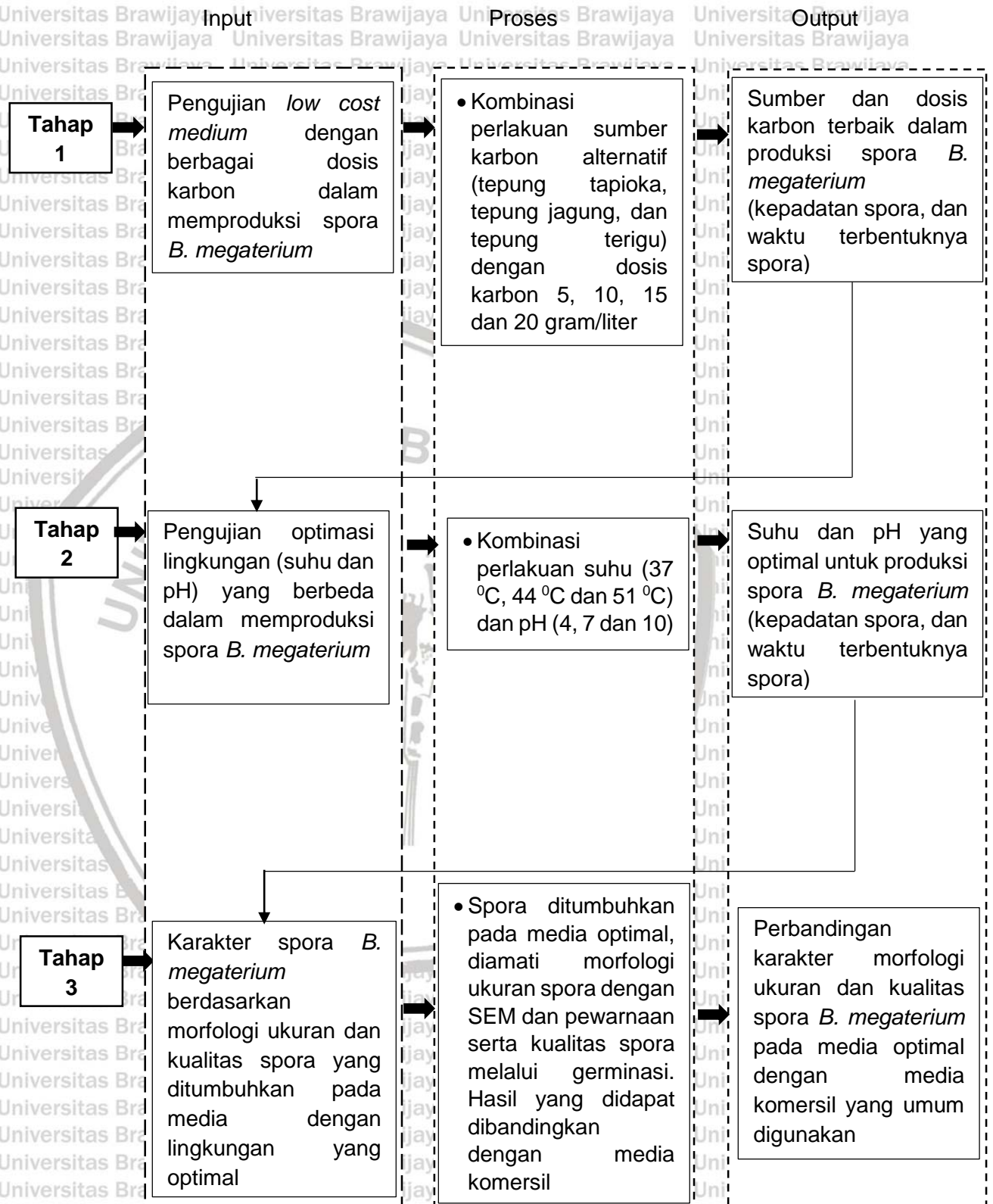
Pemanfaatan media tumbuh alternatif (*low cost medium*) yang berasal dari produk pertanian seperti tepung tapioka, tepung terigu dan tepung jagung dengan dosis optimal diharapkan dapat mengurangi biaya produksi spora tanpa mempengaruhi kepadatan spora yang dihasilkan. Sehingga produksi spora *B. megaterium* yang dievaluasi dari beberapa faktor media dan lingkungan diharapkan dapat meningkatkan produksi spora dan efisiensi sporulasi *B. megaterium*. Kerangka konsep penelitian dapat dilihat pada Gambar 12.

### 3.2 Kerangka Konsep Penelitian



**Gambar 12.** Kerangka Konsep Penelitian

### 3.3 Kerangka Operasional



Gambar 13. Kerangka Operasional Penelitian

### 3.4 Kebaruan Penelitian

Analisis kebaruan penelitian yang belum dilakukan dari penelitian sebelumnya mengenai media tumbuh spora yaitu penggunaan produk pertanian (tepung tapioka, tepung terigu dan tepung jagung) yang dievaluasi dari beberapa faktor (dosis karbon, suhu dan pH) dalam memproduksi spora *B. megaterium*. Berdasarkan kajian literatur (Tabel 1), penelitian mengenai media tumbuh spora membahas mengenai media tumbuh alternatif lain yang bersifat ramah lingkungan dalam memproduksi spora.

**Tabel 1.** Penelitian Terdahulu yang Menggunakan Media Tumbuh Alternatif

No	Judul	Tahun	Peneliti	Hasil
1.	Optimization of Enhanced Probiotic Spores Production in Submerged Cultivation of <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i> B-1895	2017	Tamar Khardziani, Kakha Sokhadze, Eva Kachishvili, Vladimir Chistyakov dan Vladimir Elisashvili	Pemanfaatan bahan yang mengandung lignoselulosa dapat digunakan sebagai media untuk produksi spora. Pada penelitiannya menunjukkan bahwa produksi spora tertinggi yaitu $10,8 \times 10^8$ spora/ml, kemudian diikuti dengan biji gandum dan dedak gandum dengan produksi spora berturut-turut yaitu $9,0 \times 10^8$ dan $8,9 \times 10^8$ spora/ml. Selain itu, penelitian ini juga menguji mengenai sumber nitrogen dalam produksi spora dengan hasil tertinggi yaitu pada $\text{KNO}_3$ $23,4 \times 10^8$ spora/ml dan ekstrak yeast $15 \times 10^8$ spora/ml.
2.	Evaluation of Industrial by-Products for the Production of <i>Bacillus thuringiensis</i> Strain	2015	Salazar-Magallon, Hernandez-Velazquez, Alvear-Garcia, Arenas-Sos dan Peña-Chora	Tiga produk sampingan dari kegiatan industri digunakan dalam produksi spora <i>Bacillus</i> . Hasil ketiga

No	Judul	Tahun	Peneliti	Hasil
	GP139 and the Pathogenicity when Applied to <i>Bemisia tabaci</i> Nymphs			produk sampingan tersebut yaitu molase dengan tepung kedelai menghasilkan $5,9 \times 10^8$ spora/ml, sukrosa dengan media keju whey spora $4,95 \times 10^8$ spora/ml dan media limbah industri jagung dengan sukrosa menghasilkan $2,04 \times 10^8$ spora/ml.
3.	Low Cost Medium for Spore Production of <i>Bacillus</i> KKU02 and KKU03 and the Effects of the Produced Spores on Growth of Giant Freshwater Prawn ( <i>Macrobrachium rosenbergii</i> de Man)	2014	Charkrit Wangka-Orm, Sirirat Deeseenthum and Vichai Leelavatcharamas	Penggunaan ekstrak cair dari singkong yang direbus sebanyak 200 g/L dapat dijadikan sebagai sumber karbon organik dengan harga murah yang ditambah 20 g/L dekstrosa sebagai media produksi spora. Hasil produksi spora yang didapat yaitu <i>Bacillus</i> KKU02 sebesar $8,32 \times 10^8$ spora/ml dan <i>Bacillus</i> KKU03 yaitu $1,35 \times 10^8$ spora/ml.
4.	Development of a Cost Effective Medium for Production of <i>Bacillus thuringiensis</i> Bioinsecticide Using Food Barley	2010	Mohammad Shojaaddini, Moharramipour, Mahyash Khodabandeh, dan Talebi	Media lokal yang memiliki jumlah produksi spora yang tertinggi yaitu campuran kacang tanah, gandum dan larutan garam dengan produksi spora yaitu $9,58 \times 10^8$ spora/ml. Kemudian diikuti oleh campuran media pati, larutan garam dan kacang tanah dengan produksi spora $9,39 \times 10^8$ spora/ml.

No	Judul	Tahun	Peneliti	Hasil
5.	Evaluation of the Growth Pattern of <i>Bacillus thuringiensis</i> Bt <sub>III</sub> in Differet Media Containing Low-Cost Agro-Industrial Based Carbon Sources	2009	Dhingra dan Chaudhary	dan Penelitiannya menggunakan media lokal sebagai sumber karbon untuk pertumbuhan bakteri <i>B. thuringiensis</i> dengan hasil tertinggi yaitu pada ekstrak kentang dengan konsentrasi 1,2% yaitu $1,24 \times 10^{10}$ cfu/ml. Jika dibandingkan dengan control Luria Bertani Broth (LB) hanya $1,1 \times 10^{10}$ cfu/ml Hasil ini menunjukkan bahwa medium LB dapat digantikan dengan ekstrak kentang yang memiliki sumber karbon dengan harga yang lebih murah.

### 3.5 Hipotesis Penelitian

Hipotesis pada penelitian ini yaitu sebagai berikut :

H<sub>0</sub> : media, dosis dan optimasi lingkungan yang sesuai tidak memberikan pengaruh terhadap produksi spora, efisiensi sporulasi, karakter morfologi dan kualitas spora *Bacillus megaterium*.

H<sub>1</sub> : media, dosis dan optimasi lingkungan yang sesuai memberikan pengaruh terhadap produksi spora, efisiensi sporulasi, karakter morfologi dan kualitas spora *Bacillus megaterium*.

### 3.6 Strategi Publikasi

Publikasi karya ilmiah merupakan tahapan setelah dilakukan penelitian. Publikasi dipersyaratkan pada Pelaksanaan Kurikulum Program Magister Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya adalah Jurnal Nasional Terakreditasi dan Jurnal Internasional. Hasil penelitian ini

akan dipublikasikan pada salah satu jurnal Internasional terindex Scopus yang dapat dilihat pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Strategi Publikasi

No.	Judul	Jurnal	Keterangan
1	Effect of different carbon doses of Tapioca flour on vegetative cells and spore production of <i>Bacillus megaterium</i>	IOP Conference Series Earth and Environmental Science	Published



## 4. MATERI DAN METODE PENELITIAN

### 4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus – Desember 2019, untuk pengujian C/N organik media tumbuh spora dilakukan di Laboratorium Kimia Tanah, Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya. Optimasi media tumbuh alternatif dan pewarnaan spora *B. megaterium* dilakukan di Laboratorium Budidaya Ikan divisi Penyakit dan Kesehatan Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya. Pengujian SEM spora *B. megaterium* dilakukan di Institut Biosains, Universitas Brawijaya.

### 4.2 Materi Penelitian

Materi penelitian ini adalah karakter *B. megaterium* dalam memproduksi spora yang akan diberi perlakuan perbedaan media alternatif (sumber dan dosis karbon) serta pengaruh optimasi lingkungan yang berbeda (suhu dan pH). Media alternatif dengan dosis terbaik yang didapat pada tahap pertama akan dievaluasi pada tahap kedua dengan perbedaan lingkungan kemudian pada tahap ketiga diamati kualitas dan ukuran dan morfologi spora yang terbentuk pada media optimal yang dibandingkan dengan media komersil. Parameter utama yang diukur pada penelitian ini yaitu kepadatan sel vegetatif, kepadatan spora, efisiensi sporulasi, kepadatan spora yang bergerminasi, *growth rate* sel vegetatif, *growth rate* spora, waktu generasi sel vegetatif dan ukuran spora *B. megaterium*. Parameter penunjang yang diukur terdiri dari visualisasi morfologi spora pada media optimal melalui pengujian SEM.

### 4.3 Alat dan Bahan Penelitian

#### 4.3.1 Alat – Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Peralatan Penelitian

No.	Alat	Fungsi
1	Autoklaf GEA®	Untuk sterilisasi basah alat-alat yang digunakan dengan suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit.
2	Lemari pendingin Cooltech Bio®	Untuk tempat penyimpanan bahan pada suhu dingin
3	Erlenmeyer 250 ml dan 500 ml Pyrex®	Untuk tempat pembuatan media <i>nutrient agar</i> (NA)
4	Erlenmeyer 100 ml Pyrex®	Untuk tempat media uji spora
5	Gelas ukur 100 ml Herma®	Untuk menakar larutan yang akan digunakan
6	Cawan petri Pyrex®	Untuk tempat media tumbuh bakteri <i>B. megaterium</i> pada media padat <i>nutrient agar</i> (NA)
7	Tabung reaksi Pyrex®	Untuk tempat peremajaan dan pengenceran bakteri <i>B. megaterium</i>
8	Bunsen	Untuk pengkondisian aseptis
9	Timbangan digital	Untuk menimbang bahan dengan ketelitian 10 <sup>-2</sup> gram
10	Colony Counter Scan® 1200 Interscience	Untuk menghitung jumlah koloni bakteri <i>B. megaterium</i>
11	Rak tabung reaksi	Untuk tempat tabung reaksi
12	Hot plate IEC®	Untuk memanaskan media tumbuh bakteri yang akan digunakan dan memanaskan sampel spora
13	Timbangan analitik Radwag®	Untuk menimbang bahan dengan ketelitian 10 <sup>-3</sup> gram
14	Vortex mixer Maxi Mix II®	Untuk menghomogenkan larutan
15	Mikropipet volume 100-1.000 µl Socorex Swiss®	Untuk mengambil bahan dalam bentuk cairan dengan volume 100-1.000 µl
16	Mikropipet volume 0,5-10 µl Socorex Swiss®	Untuk mengambil bahan dalam bentuk cairan dengan volume 0,5 – 10 µl
17	Inkubator redLINE by Binder®	Untuk menginkubasi media yang sudah ditanami bakteri pada suhu yang diinginkan
18	Bola hisap	Untuk membantu mengambil larutan melalui pipet volume
19	Triangle	Untuk membantu dalam penanaman bakteri <i>B. megaterium</i> dengan metode tebar
20	Oven redLINE by Binder®	Untuk mengeringkan cawan petri agar tidak terkontaminasi mikroorganisme
21	Washing bottle	Untuk tempat akuades
22	pH paper	Untuk mengatur pH pada media uji



Tabel 3. (Lanjutan)

No.	Alat	Fungsi
23	Sprayer	Untuk tempat menyimpan alkohol dan mineral-mineral dalam bentuk cair
24	Spatula	Untuk menghomogenkan mineral-mineral yang ditambahkan pada media uji
25	Jarum ose Pyrex®	Untuk menginokulasi bakteri saat akan dikultur
26	Pipet volume Pyrex®	Untuk mengambil larutan sebanyak 1-10 ml
27	<i>Blue tip</i>	Untuk memindahkan sampel dengan bantuan mikropipet dengan volume maksimal 1.000 $\mu$ l
28	<i>White tip</i>	Untuk memindahkan sampel dengan bantuan mikropipet dengan volume maksimal 10 $\mu$ l
29	Sendok media	Untuk membantu mengambil bahan yang digunakan dalam pembuatan media
30	Sputit 50 ml	Untuk menampung mineral sebelum difilter menggunakan filter 0,45 $\mu$ m
31	Filter 0,45 $\mu$ m	Untuk memfilter mineral $MnSO_4 \cdot H_2O$ , $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ dan $CaCl_2 \cdot 2H_2O$
32	Corong	Untuk membantu menyaring mineral menggunakan kertas saring
33	<i>Haemocytometer</i>	Untuk mengamati sel vegetatif dan spora di bawah mikroskop
34	<i>Cover glass</i>	Untuk melapisi <i>haemocytometer</i> sebelum diamati di bawah mikroskop
35	Botol valcon 15 ml	Untuk tempat mengencerkan sampel dengan akuades
36	Beaker glass 500 ml	Untuk tempat memanaskan sampel spora di atas <i>hot plate</i>
37	<i>Handtally counter</i>	Untuk membantu menghitung sel vegetatif dan spora yang diamati menggunakan <i>haemocytometer</i>
38	<i>Laminar Air Flow (LAF)</i> AirTech®	Untuk tempat dalam melakukan pengenceran, penanaman bakteri dan pengkayaan media uji
39	<i>Inkubator shaker</i>	Untuk tempat inkubasi bakteri dalam media cair <i>Nutrient Broth</i> dan media uji
40	<i>Object glass</i>	Untuk tempat dalam mengamati bakteri dan spora <i>B. megaterium</i> saat pewarnaan dibawah mikroskop

Tabel 3. (Lanjutan)

No.	Alat	Fungsi
41	Mikrotube 2 ml	Untuk wadah pengambilan sampel sel vegetatif dan spora
42	Mikroskop olympus CX21	Untuk mengamati morfologi bakteri dan spora <i>B. megaterium</i>
43	Scanning Electron Microscopy (SEM)	Untuk mengamati morfologi spora <i>B. megaterium</i>
44	Sentrifuge	Untuk memisahkan supernatant dan pellet bakteri dalam preparasi SEM
45	Spektrofotometer Thermo Scientific™ Type Genesys 20	Untuk mengukur panjang gelombang bakteri dalam menentukan kepadatan atau <i>optical density B. megaterium</i>
46	Gold sputter coating machine	Untuk melapisi preparat SEM dengan menggunakan emas

#### 4.3.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Bahan Penelitian

No.	Bahan	Fungsi
1	Tepung tapioka	Sebagai sumber karbon alternatif untuk produksi spora <i>B. megaterium</i>
2	Tepung jagung	Sebagai sumber karbon alternatif untuk produksi spora <i>B. megaterium</i>
3	Tepung terigu	Sebagai sumber karbon alternatif untuk produksi spora <i>B. megaterium</i>
4	Glukosa	Sebagai sumber karbon komersil untuk produksi spora bakteri <i>B. megaterium</i>
5	Ekstrak yeast	Sebagai sumber nitrogen komersil untuk produksi spora bakteri <i>B. megaterium</i>
6	CaCO <sub>3</sub>	Sebagai mineral pengkaya dalam produksi spora bakteri <i>B. megaterium</i>
7	MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	Sebagai mineral pengkaya dalam produksi spora bakteri <i>B. megaterium</i>
8	FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	Sebagai mineral pengkaya dalam produksi spora bakteri <i>B. megaterium</i>
9	MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	Sebagai mineral pengkaya dalam produksi spora bakteri <i>B. megaterium</i>
10	CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	Sebagai mineral pengkaya dalam produksi spora bakteri <i>B. megaterium</i>
11	Media <i>Nutrient Broth</i> (NB)	Sebagai media cair peremejaan bakteri dan media germinasi spora <i>B. megaterium</i>
12	Media <i>Nutrient Agar</i> (NA)	Sebagai media tumbuh <i>B. megaterium</i>
13	Bakteri <i>B. megaterium</i>	Sebagai bakteri yang digunakan untuk perlakuan
14	Ammonium chlorida	Sebagai sumber nitrogen pada perlakuan

Tabel 4. (Lanjutan)

No.	Bahan	Fungsi
15	Natrium chloride	Sebagai bahan pembuatan larutan natrium fisiologis 0,9% dan bahan yang ditambahkan pada media NA
16	Akuades	Sebagai bahan pelarut
17	Aluminium Foil	Sebagai bahan yang digunakan untuk membungkus alat
18	Spiritus	Sebagai bahan bakar bunsen
19	Plastik warp	Sebagai pembungkus erlenmeyer dan cawan petri yang berisi media steril
20	Kapas	Sebagai bahan untuk menutupi ujung tabung reaksi dan ujung erlenmeyer pada saat sterilisasi
21	Alkohol 70%	Sebagai bahan untuk pengkondisian aseptis
22	Kertas HVS	Sebagai pembungkus peralatan yang disterilisasi
23	Kertas Label	Sebagai bahan untuk menandai setiap perlakuan
24	Masker	Sebagai pelindung mulut bagi peneliti agar tidak mengkontaminasi setiap perlakuan yang dilakukan
25	Sarung Tangan	Sebagai bahan untuk mencegah kontaminasi
26	Tisu	Sebagai bahan untuk membersihkan alat dan bahan yang telah digunakan
27	<i>Crystal violet</i>	Sebagai pewarna primer
28	Safranin	Sebagai pewarna sekunder
29	Iodin	Sebagai pewarna untuk memperkuat pewarna primer
30	NaOH 0,1 N	Sebagai larutan untuk pengkondisian basa
31	Safranin O	Sebagai pewarna spora
32	<i>Malachite green</i>	Sebagai pewarna spora
33	Etanol 96%	Sebagai larutan untuk meluruhkan lemak dan zat warna yang tidak diserap bakteri
34	HCl 0,1 N	Sebagai larutan untuk pengkondisian asam
35	Minyak emersi	Sebagai bahan untuk membantu memperjelas objek dalam pengamatan menggunakan mikroskop
36	Kertas saring	Sebagai bahan untuk menyaring mineral sebelum difilter dengan filter 0,45 $\mu\text{m}$
37	Emas	Sebagai bahan untuk <i>coating</i> sampel SEM
38	Glutarhardehyde 3%	Sebagai bahan untuk fiksasi sampel sebelum pengamatan SEM
39	Larutan PBS	Sebagai larutan isotonis
40	Alkohol (30, 50, 70, 80 dan 96%)	Sebagai bahan untuk dehidrasi bertingkat saat preparasi sampel SEM

#### 4.4 Metode Penelitian

Metode yang digunakan pada penelitian ini yaitu metode eksperimental.

Menurut Paltridge dan Phakiti (2015), penelitian eksperimen merupakan suatu cara untuk menentukan pengaruh dari sesuatu terhadap sesuatu yang lain.

Peneliti memulai dengan sebuah ide mengapa suatu hal itu terjadi dan melakukan manipulasi paling sedikit satu variabel untuk menentukan pengaruh dari beberapa

variabel lainnya. Qasim, *et al.* (2014) menambahkan, metode eksperimen terdiri dari tiga komponen utama yaitu variabel dependen, independen dan perlakuan.

Variabel independen (variabel bebas) yaitu bagian dari keadaan yang dimanipulasi atau diubah-ubah oleh peneliti yang diberikan kepada variabel

dependen. Variabel dependen (variabel terikat) yaitu variabel yang menerima perlakuan dan diukur untuk mengetahui pengaruh dari perlakuan yang telah

diberikan. Zhellmer-Bruhn, *et al.* (2016) menambahkan, peneliti yang menggunakan metode eksperimen harus dapat mengendalikan (memanipulasi)

setiap tingkatan variabel bebas (*independent*) atau melakukan variasi terhadap variabel bebas yang diteliti. Metode ini dianggap satu-satunya metode penelitian

yang dapat menilai hubungan terjadinya sebab dan akibat.

#### 4.5 Rancangan Penelitian

Rancangan percobaan pada penelitian tahap 1 (perbedaan sumber dan dosis karbon) dan tahap 2 (perbedaan suhu dan pH) yaitu menggunakan

Rancangan Acak Lengkap Faktorial (RALF). Menurut Coolidge (2013), RAL faktorial menilai pengaruh dua atau lebih variabel bebas (disebut faktor) terhadap

variabel dependen tunggal. Rodrigues dan Lemma (2015) menambahkan, pola faktorial tidak hanya dipertimbangkan sebagai desain eksperimen tetapi juga

sebagai desain perlakuan. Setiap kombinasi merupakan sebuah perlakuan.

Menurut Choe, *et al.* (2017), model rancangan acak lengkap faktorial adalah sebagai berikut :

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + \epsilon_{ijk}; i = 1,2,\dots,a; j = 1,2,\dots,b; k=1,2,\dots,r$$

Keterangan:

- $Y_{ij}$  = pengamatan pada satuan percobaan ke-k yang memperoleh kombinasi perlakuan taraf ke-i dari faktor A dan taraf ke-j dari faktor B  
 $\mu$  = pengaruh umum  
 $A_i$  = pengaruh taraf ke-i dari faktor A  
 $\beta_j$  = pengaruh taraf ke-j dari faktor B  
 $(AB)_{ij}$  = interaksi pengaruh dari faktor A dan faktor B  
 $\epsilon_{ijk}$  = pengaruh acak dari satuan percobaan ke-k yang memperoleh kombinasi perlakuan ij

#### 4.5.1 Rancangan Penelitian Tahap 1

Penelitian tahap 1 mengenai karakter pertumbuhan *B. megaterium* dalam memproduksi spora dengan sumber dan dosis karbon yang berbeda. Penelitian pertama yang dilakukan yaitu untuk mendapatkan sumber dan dosis karbon terbaik dalam memproduksi spora *B. megaterium*. Sumber karbon yang digunakan sebagai media tumbuh spora pada penelitian ini terdiri dari tepung tapioka, tepung terigu dan tepung jagung. Dosis karbon yang digunakan yaitu 5, 10, 15 dan 20 gram/liter. Perlakuan dalam penelitian pertama ini yaitu hasil kombinasi antara faktor dari seluruh taraf perlakuan yaitu 3 x 4 kombinasi atau 12 kombinasi untuk sumber karbon dan dosis karbon. Sehingga secara keseluruhan, setelah dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali, maka penelitian tahap 1 menghasilkan 36 unit percobaan. Denah penelitian pada tahap 1 disajikan pada Gambar 14.

A1B1(3)	A1B3(3)	A3B3(3)	A2B2(2)	A2B4(3)	A3B3(2)	A1B2(2)	
A2B3(2)	A2B2(3)	A1B1(2)	A2B2(1)	A3B4(1)	A1B3(2)	A3B2(2)	
A2B1(3)	A1B1(1)	A2B3(1)	A3B2(1)	A3B2(3)	A2B4(1)	A3B4(2)	
A3B1(2)	A3B1(3)	A1B2(3)	A1B4(3)	A2B1(2)	A3B1(1)	A1B3(1)	
A1B4(1)	A2B4(2)	A1B2(1)	A2B1(1)	A2B3(3)	A3B4(3)	A3B3(1)	A1B4(2)

**Gambar 14.** Denah Penelitian Perbedaan Sumber dan Dosis Karbon

Keterangan

Faktor I adalah sumber karbon yang terdiri dari 3 perlakuan yaitu :

A1 = tepung tapioka

A2 = tepung terigu

A3 = tepung jagung

Faktor II adalah dosis karbon yang terdiri dari 4 perlakuan yaitu :

B1 = dosis 5 gram/liter

B2 = dosis 10 gram/liter

B3 = dosis 15 gram/liter

B4 = dosis 20 gram/liter

#### 4.5.2 Rancangan Penelitian Tahap 2

Setelah mendapatkan media dan dosis karbon terbaik pada penelitian tahap

1, maka penelitian dilanjutkan ke tahap 2 untuk evaluasi faktor suhu dan pH dalam

memproduksi spora *B. megaterium*. Suhu yang digunakan pada penelitian ini yaitu

37°C, 44°C dan 51°C sedangkan pH yaitu 4, 7 dan 10. Perlakuan dalam penelitian

tahap 2 ini yaitu hasil kombinasi antara faktor dari seluruh taraf perlakuan yaitu 3

x 3 kombinasi atau 9 kombinasi untuk kombinasi suhu dan pH. Sehingga secara

keseluruhan, setelah dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali, maka menghasilkan

27 kombinasi perlakuan untuk perlakuan perlakuan suhu dan pH. Denah penelitian

yang digunakan pada tahap 2 disajikan pada Gambar 15.

A3B3(2)	A1B3(1)	A3B2(2)	A1B1(3)	A1B3(2)	A3B1(1)	
A3B2(3)	A1B3(3)	A1B2(2)	A2B3(3)	A2B2(3)	A2B1(3)	A2B3(1)
A2B1(1)	A2B1(2)	A2B2(1)	A3B3(3)	A2B3(1)	A1B2(3)	A1B1(2)
A3B3(1)	A3B2(1)	A2B2(2)	A3B1(2)	A1B1(1)	A1B2(1)	A3B1(3)

**Gambar 15.** Denah Penelitian Suhu dan pH

Keterangan

Faktor I adalah suhu yang terdiri dari 3 perlakuan yaitu :

A1 = suhu 37 °C

A2 = suhu 44 °C

A3 = suhu 51 °C

Faktor II adalah pH yang terdiri dari 3 perlakuan yaitu :

B1 = pH 4

B2 = pH 7

B3 = pH 10

#### 4.6 Eksplorasi Media Tumbuh Spora *B. megaterium*

Penelitian pendahuluan media tumbuh spora *B. megaterium* diawali dengan melakukan percobaan pada media pengemban atau media dalam bentuk padat. Media pengemban yang digunakan sebagai percobaan awal yaitu tepung tapioka dengan dosis karbon yang digunakan yaitu 5 gram/liter dengan rasio C:N 5:1. Kendala yang dihadapi pada penelitian ini yaitu menentukan kadar air pada media pengemban alternatif. Perlakuan perbedaan konsentrasi kadar air yang digunakan yaitu 10%, 20%, 30%, 40% dan 50%. Hari keempat setelah media pengemban di inkubasi pada inkubator, terdapat jamur yang tumbuh pada media padat dan mengalami perubahan warna pada media menjadi kecoklatan. Selain itu, penggunaan media padat juga lebih rentan terhadap kontaminasi karena penambahan mineral dilakukan melalui penyemprotan pada media yang diletakkan di cawan petri.

Berdasarkan kendala penggunaan media padat sebagai media tumbuh spora, maka dicoba untuk menggunakan media dalam bentuk cair. Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa, media dalam bentuk cair dapat memproduksi spora *Bacillus* (Yuniarti, *et al.*, 2019). Implementasi media cair sebagai media tumbuh spora juga menunjukkan adanya kendala dalam menggunakan sumber nitrogen. Sumber nitrogen yang digunakan pada awal penelitian yaitu urea. Media cair yang terdiri dari komposisi sumber karbon (tepung terigu, tepung tapioka dan tepung jagung) dan sumber nitrogen (urea) dengan dosis 10, 15 dan 20 gram/liter setelah dilakukan sterilisasi menunjukkan kondisi media yang berubah menjadi *gel*. Media yang menjadi *gel* tidak digunakan untuk menumbuhkan spora karena tidak dapat larut dengan mineral dan bakteri yang ditambahkan ketika diinkubasi pada inkubator shaker. Sehingga dari permasalahan sumber nitrogen berupa urea tersebut, digunakan sumber nitrogen lain yaitu ammonium chloride dengan konsentrasi nitrogen sebesar 26,16%.

Penggunaan rasio C:N pada penelitian ini mengacu pada penelitian pendahuluan yaitu menggunakan rasio C:N berbeda yaitu 5:1, 8:1 dan 11:1. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rasio C:N 5:1 dapat memproduksi spora sebesar  $3,63 \times 10^7$  spora/ml lebih tinggi jika dibandingkan dengan perlakuan lain. Penggunaan dosis karbon yang berbeda pada penelitian ini untuk mengetahui apakah ketika jumlah karbon ditingkatkan dengan rasio C:N yang optimal yaitu 5:1 memberikan pengaruh terhadap produksi spora *B. megaterium*.

## 4.7 Prosedur Penelitian

### 4.7.1 Kultur dan Peremajaan Isolat Bakteri *B. megaterium*

Isolat bakteri *B. megaterium* yang digunakan dalam penelitian ini yaitu spesies bakteri yang diisolasi dari saluran pencernaan udang vaname yang berasal dari tambak budidaya udang vaname di Tuban, Jawa Timur dan telah dikonfirmasi melalui uji molekuler 16SrRNA. Isolat bakteri dikultur dengan menggunakan media cair *Nutrient Broth* (NB) dan media padat *Nutrient Agar* (NA). Pada media *Nutrient Agar* (NA) dilakukan penambahan NaCl sebanyak 2% (Menocci, *et al.*, 2008) untuk menumbuhkan bakteri *B. megaterium*. Stok murni *B. megaterium* ditumbuhkan pada NA-NaCl steril dengan metode *streak* 4 kuadran untuk mendapatkan isolat murni. Koloni bakteri yang tumbuh dari hasil *streak* 4 kuadran kemudian diambil menggunakan jarum ose untuk ditumbuhkan pada media agar miring NA-NaCl. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 30°C pada inkubator dan disimpan di *refrigerator* untuk stok isolat bakteri. Peremajaan isolat bakteri *B. megaterium* yaitu menggunakan media *Nutrient Broth* (NB) dengan cara mengambil 1 ose isolat koloni bakteri dari media agar miring NA-NaCl dan diinokulasikan ke media NB steril. Setelah itu, diinkubasi pada *inkubator shaker* dengan kecepatan 125 rpm selama 18 jam pada suhu 37°C.



Penentuan kepadatan awal dari isolat murni bakteri *B. megaterium* yaitu dengan membuat kurva standar menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC) dan spektrofotometer untuk melihat nilai absorbansi (*optical density*). Kurva standar yang didapat dengan membandingkan nilai absorbansi dan jumlah koloni sehingga mendapatkan persamaan  $y = ax + b$  (Zhang, *et al.*, 2015; Hu, *et al.*, 2017). Rumus perhitungan koloni bakteri berdasarkan SNI (2006), sebagai berikut:

$$N = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2)] \times (d)}$$

Keterangan:

- N : Jumlah koloni produk (kol/ml)
- $\sum C$  : Jumlah koloni pada semua cawan yang dihitung (kol)
- $n_1$  : Jumlah cawan pada pengenceran pertama yang dihitung
- $n_2$  : Jumlah cawan pada pengenceran kedua yang dihitung
- d : Pengenceran pertama yang dapat dihitung

#### 4.7.2 Produksi Spora pada Sumber dan Dosis Karbon yang Berbeda

Penelitian ini akan dievaluasi mengenai pengaruh sumber dan dosis karbon yang berbeda dalam memproduksi spora *B. megaterium*. Tujuan dari perlakuan perbedaan sumber dan dosis karbon yang berbeda yaitu untuk mendapatkan sumber dan dosis karbon terbaik dalam memproduksi spora *B. megaterium*. Pada penelitian ini menggunakan RAL faktorial sehingga terdapat kombinasi antar perlakuan sumber dan dosis karbon. Sumber karbon organik yang digunakan pada penelitian ini berasal dari produk pertanian yaitu tepung tapioka, tepung jagung dan tepung terigu. Selain sumber karbon, media uji juga diperkaya dengan *ammonium chloride* ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) sebagai sumber nitrogen. Perlakuan kontrol yang didapatkan dari penelitian pendahuluan menggunakan media komersil dengan komposisi glukosa sebagai sumber karbon dan *extract yeast* sebagai sumber nitrogen. Persentase rasio C:N yang terkandung pada setiap sumber karbon dan nitrogen yang digunakan pada penelitian ini disajikan pada Tabel 5.

**Tabel 5.** Rasio C:N Sumber Karbon dan Nitrogen

Sumber C:N	Rasio Karbon	Rasio Nitrogen
Tepung tapioka	41,13%	0,025%
Tepung terigu	49,96%	1,76%
Tepung jagung	34,45%	0,15%
Glukosa	40,07%	0,17%
<i>Ammonium chloride</i>	-	26,16%
<i>Extract yeast</i>	23,45%	10,86%
<i>Nutrient broth</i>	38,89%	11,95%

Keterangan : (Hasil Pengujian dilakukan di Laboratorium Kimia Tanah Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya, 2019).

Media uji terdiri dari sumber karbon (tepung tapioka, tepung terigu dan tepung jagung), sumber nitrogen (*ammonium chloride*) dan penambahan garam-garam mineral. Setiap perlakuan sumber karbon ditimbang menyesuaikan dosis karbon yang digunakan yaitu 5, 10, 15 dan 20 gram/liter, sedangkan sumber nitrogen menyesuaikan dosis karbon untuk mendapatkan rasio C/N 5:1.

Penggunaan rasio C/N 5:1 dikarenakan pada penelitian pendahuluan pada perlakuan kontrol (glukosa dan *extract yeast*) menghasilkan produksi spora tertinggi yaitu sebesar  $3,63 \times 10^7$  spora/ml jika dibandingkan dengan rasio C/N 8:1 dan 11:1. Media uji yang sudah ditimbang, dimasukkan ke dalam erlenmeyer 100 ml untuk kemudian dilarutkan dengan akuades sebanyak 50 ml dan dihomogenkan. Setelah itu, media uji disterilisasi dengan menggunakan autoklaf (suhu  $121^{\circ}\text{C}$ , tekanan 1 atm selama 15 menit) kemudian diperkaya dengan mineral-mineral untuk menumbuhkan spora *B. megaterium*. Mineral-mineral yang digunakan berdasarkan penelitian Yuniarti, *et al.* (2019) dengan sedikit modifikasi yaitu  $\text{CaCO}_3$  0,3 gram,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,00033 gram,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,12 gram,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,084 gram dan  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,09 gram yang masing-masing dilarutkan ke dalam 1 liter akuades. Mineral-mineral seperti  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dan  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  dilakukan sterilisasi terlebih dahulu sebelum digunakan yaitu dengan menggunakan filter berukuran  $0,45 \mu\text{m}$  berdasarkan modifikasi metode Jinks, *et al.* (1985). Sedangkan mineral lainnya yaitu  $\text{CaCO}_3$  dan  $\text{MgSO}_4$ .

7H<sub>2</sub>O disterilisasi menggunakan autoklaf (suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit). Setiap mineral dibuat larutan induk sebagai stok. Selanjutnya larutan induk dari setiap mineral ditakar dan ditambahkan pada media uji menyesuaikan dengan konsentrasi mineral yang diinginkan pada media uji.

Penambahan bakteri *B. megaterium* bertujuan sebagai *stater* untuk menumbuhkan spora bakteri di media uji. Langkah pertama yaitu melakukan inokulasi inokulan bakteri *B. megaterium* yang telah tumbuh di media NB (inkubasi 18 jam di inkubator shaker dengan suhu 37 °C, 120 rpm) dengan kepadatan inokulan yang telah dihitung. Bakteri yang ditambahkan ke media uji sebanyak 1% (v/v) berdasarkan metode Monteiro, *et al.* (2014). Sehingga inokulasi bakteri *B. megaterium* ke media uji yaitu sebanyak 0,5 ml menyesuaikan volume dari media yang digunakan (50 ml).

Pengambilan sampel untuk pengamatan sel vegetatif *B. megaterium* secara mikroskopik dilakukan pada menit ke- 0, 15 dan 30 menit. Kemudian berlanjut setiap 1 jam sekali sampai pada 6 jam, dan berlanjut setiap 2 jam sekali sampai 24 jam. Sedangkan pengamatan sporulasi dilakukan setiap 12 jam selama 120 jam. Sampel yang diambil setiap perlakuan selama pengamatan vegetatif dan sporulasi yaitu sebanyak 2 ml kemudian diletakkan ke dalam mikrotube 2 ml. Perhitungan kepadatan sel vegetatif (sel/ml) dan spora (spora/ml) *B. megaterium* dengan melakukan pengenceran menggunakan akuades sebelum diamati dengan *haemocytometer* pada mikroskop dengan pembesaran 1000x.

#### 4.7.3 Produksi Spora pada Beberapa Suhu dan pH

Setelah mendapatkan sumber dan dosis karbon yang terbaik dalam menumbuhkan spora, maka penelitian dilanjutkan dengan pengujian suhu dan pH.

Suhu dan pH merupakan faktor lingkungan yang mempengaruhi produksi spora yang dihasilkan (Eschlbeck, *et al.*, 2017). Genus *Bacillus* memiliki toleransi

lingkungan yang luas yaitu suhu 30-50 °C (Berendsen, *et al.*, 2016) dan pH 5-9 (Erem, *et al.*, 2018). Penelitian ini menggunakan RAL faktorial sehingga terdapat kombinasi antar perlakuan suhu dan pH. Perlakuan suhu pada penelitian ini yaitu 37 °C, 44 °C dan 51 °C sedangkan perlakuan pH yaitu pH 4, 7 dan 10. Indikator asam dan basa yang digunakan yaitu HCl 0,1 N dan NaOH 0,1 N untuk mendapatkan pH yang diinginkan (Gomez dan Reis, 2013). Sumber karbon dengan dosis karbon terbaik pada penelitian tahap pertama ditimbang dan dimasukkan ke erlenmeyer 100 ml. Kemudian dilarutkan dengan akuades sebanyak 50 ml dan diperkaya dengan mineral yang sama seperti pada penelitian tahap pertama. Sebelum media uji disterilisasi dengan autoklaf, pH media uji diatur berdasarkan perlakuan.

Media uji yang sudah disterilisasi ditambahkan bakteri *B. megaterium* sebagai *stater* sebanyak 1% (v/v) berdasarkan metode Monteiro, *et al.* (2014). Kemudian media uji diinkubasi pada suhu masing-masing perlakuan di inkubator *shaker*. Pengambilan sampel untuk pengamatan sel vegetatif dilakukan pada menit ke 0, 15 dan 30 kemudian dilanjutkan setiap 1 jam sekali sampai 6 jam dan setiap 2 jam sekali sampai 24 jam. Sedangkan pengamatan sporulasi dilakukan setiap 12 jam selama 120 jam. Sampel diambil sebanyak 2 ml setiap jam pengambilan sampel dan diletakkan pada mikrotube 2 ml. Perhitungan kepadatan sel vegetatif (sel/ml) dan spora (spora/ml) *B. megaterium* dengan melakukan pengenceran menggunakan akuades sebelum diamati pada *haemocytometer* dengan pembesaran mikroskop 1000x.

#### 4.7.4 Pertumbuhan Sel Vegetatif *B. megaterium*

Perhitungan kepadatan sel vegetatif bakteri *B. megaterium* pada semua perlakuan yang diberikan (perbedaan sumber dan dosis karbon, suhu dan pH) dilakukan dengan menggunakan metode *haemocytometer*. Perhitungan mikroskopis sel vegetatif *B. megaterium* dilakukan mulai jam ke- 0, 15 menit dan

30 menit, selanjutnya dihitung setiap 1 jam sekali hingga 6 jam serta 2 jam sekali sampai 24 jam. Perhitungan sel vegetatif dilakukan dengan mengencerkan sampel terlebih dahulu yaitu sebanyak 0,5 ml ke dalam 4,5 ml akuades. Tujuan pengenceran ini yaitu untuk membantu proses perhitungan sel vegetatif. Sampel bakteri yang telah diencerkan, kemudian dihomogenkan dengan *vortex mixer* dan diteteskan dengan menggunakan pipet tetes pada *haemocytometer* yang sudah ditutup dengan *cover glass* sampai tidak terdapat gelembung. *Cover glass* ditetesi minyak emersi sebelum dilakukan pengamatan pada mikroskop. Pembesaran mikroskop yang digunakan yaitu 1000x dan dihitung jumlah sel vegetatif pada 5 bidang pandang. Menurut Mather dan Roberts (1998), rumus perhitungan kepadatan sel vegetatif menggunakan *haemocytometer* yaitu sebagai berikut:

$$\text{Jumlah sel} = \frac{n}{\text{jumlah bidang pandang}} \times 25 \times 10^4 \times \text{faktor pengenceran}$$

Keterangan:

- n : jumlah sampel pada 5 bidang pandang
- 25 : total bidang pandang yang diamati
- $10^4$  : volume dari *haemocytometer*

#### 4.7.5 Produksi Spora *B. megaterium*

Perhitungan spora mulai dilakukan setelah sel vegetatif *B. megaterium* bertransisi menjadi spora. Penentuan untuk mengetahui telah terbentuknya spora lengkap dapat melalui 2 cara yaitu melalui pewarnaan spora dan kepadatan vegetatif yang telah menunjukkan fase stasioner atau mengalami penurunan kepadatan. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Cheung, *et al.* (1982), transisi dari pertumbuhan eksponensial ke fase stasioner terjadi secara cepat ketika kondisi glukosa atau nitrogen terbatas. Titik transisi menunjukkan tingkat pertumbuhan sel bakteri mulai menurun yang ditandai dengan konsentrasi nutrisi yang terbatas. Pernyataan ini didukung oleh Ghosh, *et al.* (2009), pada kultur secara *in vitro*, fase stasioner menunjukkan sel bakteri mendekati dengan keadaan

dorman yang ditandai dengan kondisi minimal dari metabolisme atau replikasi yang terhambat.

Perhitungan spora lengkap pada semua perlakuan yang diberikan (perbedaan sumber dan dosis karbon, suhu dan pH) dilakukan dengan menggunakan metode *haemocytometer*. Langkah awal yang dilakukan yaitu dengan mengambil sampel yang telah ditakar sebanyak 2 ml pada mikrotube selama proses sporulasi untuk dilakukan perhitungan. Pengambilan sampel spora sebanyak 2 ml dilakukan setiap 12 jam sekali selama 120 jam dan sampel dipanaskan terlebih dahulu pada suhu 80 °C selama 15 menit. Kegiatan pemanasan sampel rutin dilakukan untuk mematikan sel vegetatif. Metode ini berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Valicente, *et al.* (2008), perhitungan jumlah spora dapat dilakukan dengan memanaskan sampel pada suhu 80 °C selama 15 menit. Perhitungan kepadatan spora yang telah dipanaskan dilakukan dengan mengencerkan sampel terlebih dahulu yaitu sebanyak 0,5 ml ke dalam 4,5 ml akuades. Tujuan pengenceran ini yaitu untuk membantu proses perhitungan spora. Sampel spora yang telah diencerkan, kemudian ditetaskan dengan menggunakan pipet tetes pada *haemocytometer* yang sudah ditutup dengan *cover glass* sampai tidak terdapat gelembung. *Cover glass* ditetesi minyak emersi sebelum dilakukan pengamatan pada mikroskop. Pembesaran mikroskop yang digunakan yaitu 1000x dan dihitung jumlah sel vegetatif pada 5 bidang pandang. Menurut Mather dan Roberts (1998), rumus perhitungan kepadatan spora menggunakan *haemocytometer* yaitu sebagai berikut:

$$\text{Jumlah spora} = \frac{n}{\text{jumlah bidang pandang}} \times 25 \times 10^4 \times \text{faktor pengenceran}$$

Keterangan:

n : jumlah sampel pada 5 bidang pandang

25 : total bidang pandang yang diamati

10<sup>4</sup> : volume dari *haemocytometer*

#### 4.7.6 Efisiensi Sporulasi *B. megaterium*

Efisiensi sporulasi dapat didefinisikan sebagai persentase sel vegetatif yang mengalami proses sporulasi lengkap dengan menghasilkan spora yang tahan terhadap panas. Efisiensi sporulasi dapat dihitung sebagai rasio antara jumlah spora dan sel vegetatif maksimum (Monteiro, *et al.*, 2014). Perhitungan efisiensi sporulasi dapat dilakukan secara bersamaan dengan produksi spora yang dihasilkan. Perhitungan efisiensi sporulasi dapat menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Efisiensi Sporulasi} = \frac{\text{Spora Maksimal}}{\text{Vegetatif}} \times 100\%$$

#### 4.7.7 Perkecambahan *B. megaterium*

Perkecambahan bakteri *B. megaterium* bertujuan untuk mengetahui kualitas dari spora. Spora bakteri yang berkecambah dapat diasumsikan sebagai jumlah spora yang kembali membentuk sel vegetatif ketika kondisi lingkungan mulai dalam keadaan yang membaik (Powell dan Hunter, 1955). Lingkungan yang membaik dapat ditinjau dari kondisi nutrisi yang mulai tercukupi dan parameter lingkungan yang berada dalam kisaran optimal. Metode perkecambahan yaitu menggunakan kembali sisa sampel spora yang memiliki jumlah spora lengkap tertinggi sesuai perlakuan dan sebelumnya sudah dipanaskan pada suhu 80°C selama 15 menit. Perkecambahan spora *B. megaterium* dilakukan dengan menggunakan media NB (*Nutrient Broth*) yang telah disterilisasi dengan volume 50 ml. Kemudian, media NB tersebut ditanam spora *B. megaterium* tertinggi sesuai perlakuan dengan kepadatan yang diinginkan di media tumbuh sebanyak  $10^6$  sel/ml. Hasil inokulasi spora pada media uji diinkubasi pada inkubator *shaker* dengan kecepatan 120 rpm selama 24 jam pada suhu 37°C. Metode perhitungan spora yang berkecambah menjadi vegetatif dilakukan setiap 0, 2, 3, 5, 10, 15, 30 menit, kemudian 1 jam sekali hingga 6 jam dan 2 jam sekali sampai 24 jam di

*haemocytometer*. Menurut Mather dan Roberts (1998) rumus perhitungan kepadatan sel vegetatif bakteri menggunakan *haemocytometer* adalah sebagai berikut:

$$\text{Jumlah sel} = \frac{n}{\text{jumlah bidang pandang}} \times 25 \times 10^4 \times \text{faktor pengenceran}$$

Keterangan:

n : jumlah sampel pada 5 bidang pandang

25 : total bidang pandang yang diamati

$10^4$  : volume dari *haemocytometer*

#### 4.7.8 Growth Rate (GR) Sel Vegetatif dan Spora *B. megaterium*

Pertumbuhan bakteri berkaitan dengan peningkatan biomassa dan jumlah mereka. Berdasarkan populasi bakteri yang mengalami proses pertumbuhan dan membelah diri, pertumbuhan maksimum dapat diamati pada fase eksponensial yaitu rata-rata pertumbuhan per unit waktu yang dapat berubah setiap waktu (Hardy, 2002). *Growth rate* (GR) berperan penting dalam membentuk genetika mikrobial, biokimia, biologi dan fisiologi molekuler. Tujuan pengukuran *growth rate* yaitu untuk menentukan rata-rata perubahan jumlah sel di dalam media kultur per unit waktu (menit atau jam) yang digunakan (Hall, *et al.*, 2013). Pengamatan laju pertumbuhan maksimum bakteri dapat dilakukan dengan membuat kurva pertumbuhan bakteri yang didapatkan dari hasil pengamatan berdasarkan periode waktu yang telah ditentukan, kemudian digunakan laju peningkatan maksimum bakteri untuk mendapatkan persamaan  $y = ax + b$ . Prosedur yang sama juga dilakukan untuk mendapatkan laju pertumbuhan maksimum dari spora *B. megaterium*.

#### 4.7.9 Generation Time (GT) Sel Vegetatif *B. megaterium*

Waktu generasi yaitu waktu yang diperlukan untuk menggandakan populasi awal selama fase pertumbuhan eksponensial. Umumnya, waktu generasi memiliki hubungan yang berbanding lurus dengan laju pertumbuhan spesifik bakteri (Soro-



Yao, *et al.*, 2014). Waktu generasi *B. megaterium* dalam bentuk vegetatif dapat diestimasi dengan menggunakan rumus Van Heerden, *et al.* (2017) yaitu sebagai berikut ;

$$T_g = \frac{\ln(2)}{k}$$

Keterangan:

$T_g$  : Waktu generasi

$\ln(2)$  : Jumlah generasi bakteri

$k$  : maksimum *specific growth rate* (SGR)

#### 4.7.10 Pewarnaan Spora *B. megaterium*

Pewarnaan spora menggunakan metode pewarnaan *Schaeffer-Fulton* yaitu dengan mengambil inokulum spora bakteri *B. megaterium* yang ditumbuhkan pada media NA-NaCl dan digoreskan pada objek glass steril menggunakan jarum ose. Kemudian inokulum bakteri pada objek glass diencerkan menggunakan akuades. Setelah preparat kering kemudian ditetaskan dengan *Malachite green* (dibuat dengan melarutkan 5 gram dalam 100 ml akuades). Selanjutnya diuapkan di atas *water bath* selama 5 menit. Setelah kondisi preparat dingin, preparat dibilas menggunakan akuades. Preparat diberi pewarnaan dengan safranin O (dibuat dengan melarutkan 0,5 gram bubuk safranin O dalam 100 ml akuades) selama 2 menit dan dibilas kembali menggunakan akuades. Preparat yang telah kering kemudian diamati dibawah mikroskop kemudian ditetesi minyak emersi dan diamati dibawah mikroskop dengan pembesaran 1000x (Mormak dan Casida, 1985; Sneath, *et al.*, 1986).

#### 4.7.11 Karakter Morfologi (Ukuran) Spora *B. megaterium* dengan menggunakan SEM (*Scanning Electron Microscopy*)

Pembuatan preparat spora *B. megaterium* dilakukan dengan 3 perlakuan yaitu ditumbuhkan pada media optimal yang dibandingkan dengan media komersil (glukosa dan *difco sporulation medium*). Hasil penelitian pada tahap 1 dan tahap

2 yaitu setelah mendapatkan media yang optimal dengan evaluasi berbagai faktor (sumber karbon, dosis karbon, suhu dan pH) maka sampel spora disiapkan untuk pengujian SEM. Tujuan SEM pada penelitian ini yaitu untuk mengetahui gambaran morfologi *B. megaterium* dalam bentuk spora setelah ditumbuhkan pada media yang optimal. Preparasi SEM dilakukan dengan mengkultur spora *B. megaterium* selama 120 jam yang menyesuaikan kepadatan spora tertinggi pada media optimal. Kemudian diukur OD dari sampel yang telah diinkubasi dengan menggunakan spektrofotometer. 1 ml dari media cair tersebut disentrifugasi sebanyak 1 kali (2000 x g, 4 °C). Selanjutnya diinkubasi menggunakan glutaraldehyde 3% selama 30 menit dan dihomogenkan. Hasil tersebut dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali dan disentrifugasi kembali sebanyak 3 kali dalam waktu masing-masing 10 menit (2000 x g, 4 °C). Pellet yang didapat diletakkan di *cover glass* dan dikering anginkan di atas bunsen untuk selanjutnya didehidrasi dengan alkohol berseri (30%, 50%, 70%, 80%, 90% dan 96%). Langkah terakhir yaitu di lapisi menggunakan emas dan diamati dengan mikroskop SEM TM 300. Metode preparasi dan pengamatan SEM yang digunakan pada penelitian ini mengacu pada metode Mustafa, *et al.* (2010) yang dimodifikasi. Pengukuran panjang dan lebar spora yang telah dilapisi emas dengan melakukan pengamatan menggunakan SEM yang nantinya dilakukan analisis pada ukuran spora yang tampil pada komputer. Spora yang diukur bagian panjang dan lebarnya menggunakan satuan  $\mu\text{m}$ .

#### 4.8 Analisa Data

Data yang dianalisis secara statistik berdasarkan rancangan penelitian yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap Faktorial (RALF) menggunakan software program SPSS ver. 24 *for windows*. Apabila terdapat perbedaan antar perlakuan maka dilanjutkan dengan Duncan's Multiple Range Test (DMRT) untuk

mengetahui pengaruh media alternatif yang telah dievaluasi dalam beberapa faktor (sumber dan dosis karbon serta suhu dan pH) terhadap produksi spora dan efisiensi sporulasi *B. megaterium* yang dihasilkan.



## 5. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Penelitian Tahap 1

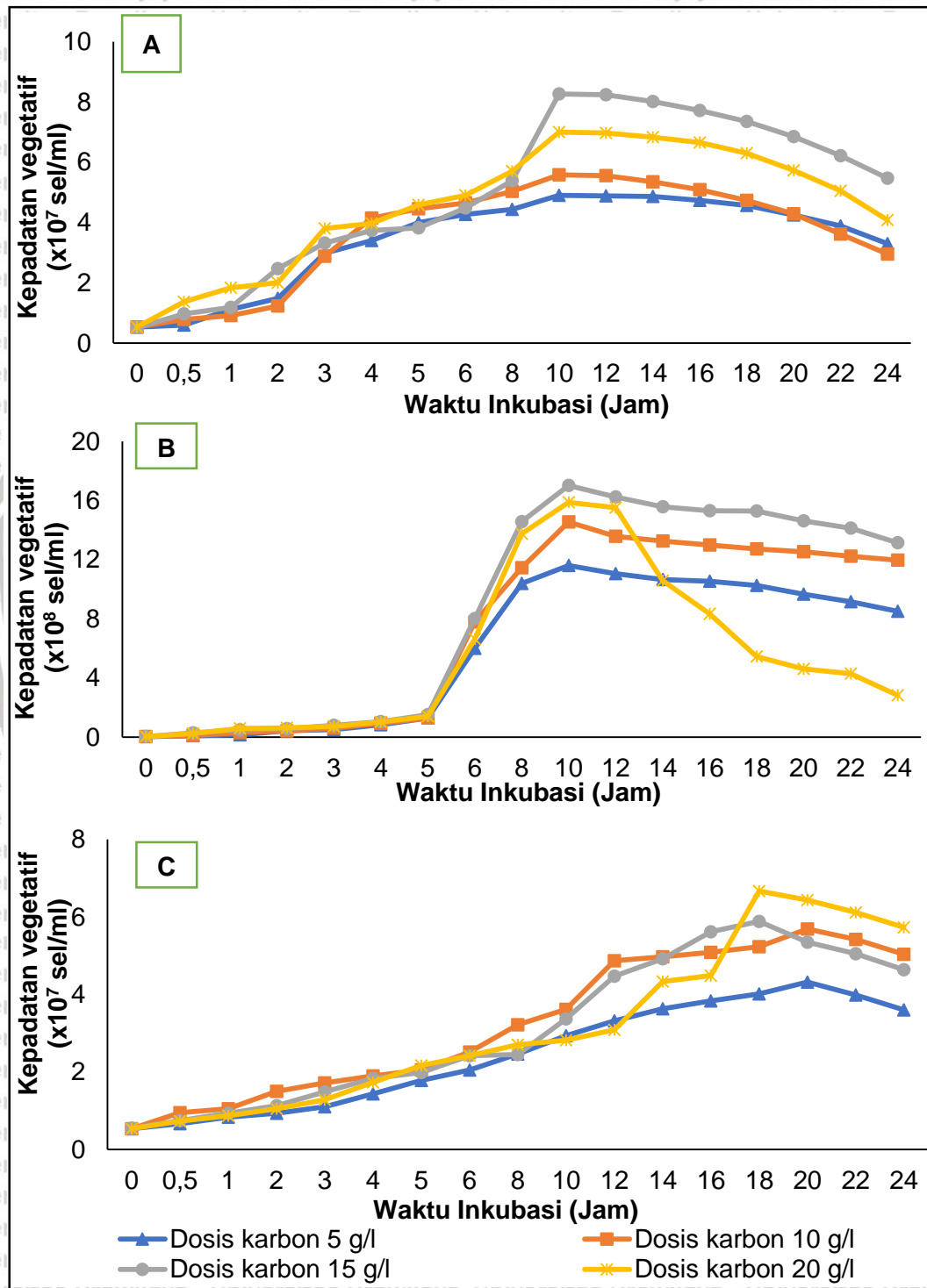
Penelitian tahap 1 bertujuan untuk mendapatkan kombinasi *low cost medium* dengan dosis karbon yang sesuai dalam memproduksi spora *B. megaterium*. Sehingga nantinya media dan dosis karbon terbaik dapat digunakan untuk optimasi lingkungan (suhu dan pH) yang diberikan dalam memproduksi spora *B. megaterium*.

#### 5.1.1 Kepadatan Sel Vegetatif

Pola pertumbuhan sel vegetatif *B. megaterium* pada penelitian ini dengan menggunakan sumber dan dosis karbon yang berbeda disajikan pada Gambar 16. Kepadatan sel vegetatif diamati melalui pola pertumbuhan yang terdiri dari beberapa fase yaitu fase lag, fase eksponensial, fase stationer dan fase kematian. Sel vegetatif *B. megaterium* dengan berbagai waktu pengambilan sampel menunjukkan adanya perbedaan hasil kepadatan yang didapat. Pola pertumbuhan dari semua kombinasi perlakuan menunjukkan tren grafik yang hampir sama, meskipun beberapa perlakuan tidak terlihat adanya fase stasioner.

Fase lag merupakan fase penyesuaian diri bakteri pada media kultur baru yang rata-rata terjadi di menit ke-8 pada tepung terigu dan menunjukkan lag time paling cepat jika dibandingkan dengan perlakuan lain. Pertumbuhan sel vegetatif secara bertahap meningkat hingga mencapai puncak eksponensial pada jam ke-10 pada media tepung tapioka dan tepung terigu. Akan tetapi pada tepung jagung mencapai puncak eksponensial dalam durasi waktu yang lebih lama yaitu rata-rata 18 jam pada setiap perlakuan. Fase stationer terjadi pada semua perlakuan dosis karbon di media tepung tapioka dan dosis 10 gram/liter di media tepung terigu. Kombinasi perlakuan dosis dan media lainnya khususnya tepung jagung tidak terlihat adanya fase stationer dan mungkin dicapai selama selang 1 jam

sebelum fase penurunan sel vegetatif yang tidak teramati pada penelitian ini. Setelah melewati fase stasioner, kepadatan sel vegetatif menurun hingga akhir dari waktu inkubasi yang disebabkan nutrisi di media kultur semakin berkurang.



**Gambar 16.** Fase Pertumbuhan Sel Vegetatif *B. megaterium* pada Media dan Dosis karbon dalam Beberapa Waktu Inkubasi: A) Tepung Tapioka; B) Tepung Terigu; C) Tepung Jagung.

Setiap fase pertumbuhan yang diamati pada masing-masing kombinasi perlakuan sumber dan dosis karbon menunjukkan adanya perbedaan durasi waktu inkubasi untuk mencapai fase pertumbuhan tersebut. Perbedaan fase pertumbuhan *B. megaterium* juga diamati oleh Shakoor, *et al.* (2013); bakteri mencapai puncak eksponensial dalam waktu 24 jam pada media luria bertani (LB) dan tidak menunjukkan fase stasioner, berbeda dengan media CMC-Na, bakteri mencapai fase eksponensial pada waktu 16 jam dan menunjukkan fase stasioner sampai 20 jam. Omran, *et al.* (2013) juga mengkonfirmasi perbedaan fase pertumbuhan bakteri pada media glukosa M9 yang mencapai fase eksponensial dalam waktu 9 hari dengan kepadatan bakteri 4x lebih banyak jika dibandingkan dengan media sucralosa M9 yang mencapai fase eksponensial pada hari keenam.

Dosis karbon tertinggi pada penelitian ini (20 g/L) menunjukkan puncak eksponensial yang lebih rendah jika dibandingkan dengan dosis karbon 15 g/L pada media tepung tapioka dan tepung terigu. Kondisi ini disebabkan karena ketersediaan karbon yang berlebih di lingkungan dapat menghambat kemampuan bakteri untuk menggunakan karbon sebagai sumber nutrisi yang menunjang kehidupannya. Selain itu kandungan bahan organik khususnya karbon yang terkandung pada tepung terigu memiliki konsentrasi mencapai 49% dan lebih besar dari tepung lainnya. Pemberian dosis dan konsentrasi karbon yang berlebih dapat menyebabkan bakteri tidak dapat mengabsorpsi karbon secara optimal. Karbon merupakan faktor pembatas pertumbuhan bakteri (Demoling, *et al.*, 2007; Ceuvas, *et al.*, 2011). Penelitian yang dilakukan oleh Leone, *et al.* (2015) menunjukkan kelebihan konsentrasi asetat sebagai sumber karbon di lingkungan kultur dapat menyebabkan ketidakseimbangan metabolisme karbon pada tubuh bakteri yang selanjutnya dapat menghambat pertumbuhan bakteri secara seluler.

Kepadatan sel vegetatif tertinggi pada masing-masing media secara berurutan yaitu tepung tapioka dosis 15 g/L ( $8,3 \times 10^7$  sel/ml), tepung terigu dosis

15 g/L ( $1,7 \times 10^9$  sel/ml) dan tepung jagung dosis 20 g/L ( $6,7 \times 10^7$  sel/ml). Sumber karbon pada media kultur yang berbeda memberikan respon pertumbuhan sel vegetatif yang berbeda (Nur, *et al.*, 2016; Mikkelsen, *et al.*, 2019). Selain itu, konsentrasi sumber karbon di lingkungan mempengaruhi produksi sel vegetatif (Molina-Ramirez, *et al.*, 2017). Karbon merupakan faktor pembatas dalam pertumbuhan bakteri karena memiliki fungsi sebagai sumber energi terutama untuk bakteri heterotrofik (Alden, *et al.*, 2001; Ceuvas, *et al.*, 2011). Sehingga sumber dan dosis karbon harus diperhatikan pada media kultur untuk mendapatkan produksi sel vegetatif yang tinggi.

Berdasarkan hasil Two Way ANOVA (Lampiran 6) diketahui bahwa kombinasi media dan dosis karbon yang berbeda memberikan pengaruh terhadap kepadatan sel vegetatif *B. megaterium* ( $p < 0,05$ ). Selain itu, terdapat interaksi antara perlakuan media dan dosis karbon ( $p < 0,05$ ) yang menunjukkan bahwa perbedaan hasil kepadatan sel vegetatif dipengaruhi oleh kedua faktor tersebut. Selanjutnya untuk mengetahui perbedaan antar kombinasi perlakuan yang diberikan, dilanjutkan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan uji Duncan. Hasil uji Duncan menunjukkan bahwa kombinasi perlakuan media dan dosis karbon memberikan hasil rata-rata kepadatan sel vegetatif pada rentang waktu tertentu yang berbeda nyata. Hasil uji Duncan kepadatan sel vegetatif pada waktu inkubasi 5 jam, 10 jam dan 18 jam secara berturut-turut disajikan pada Tabel 6, 7 dan 8.

**Tabel 6.** Kepadatan Sel Vegetatif *B. megaterium* Setiap Kombinasi Perlakuan ( $\times 10^8$  sel/ml) pada Waktu Inkubasi 5 Jam

Media (Tepung)	Dosis Karbon (g/L)				Rataan
	5	10	15	20	
Tapioka	0,40±0,00	0,45±0,01	0,38±0,01	0,46±0,01	0,42±0,04 <sup>b</sup>
Terigu	1,30±0,00	1,30±0,00	1,50±0,00	1,40±0,00	1,38±0,09 <sup>c</sup>
Jagung	0,18±0,00	0,21±0,06	0,20±0,00	0,22±0,1	0,20±0,02 <sup>a</sup>
<b>Rataan</b>	<b>0,63±0,59<sup>a</sup></b>	<b>0,65±0,57<sup>b</sup></b>	<b>0,69±0,70<sup>c</sup></b>	<b>0,69±0,62<sup>c</sup></b>	

Keterangan: Huruf yang berbeda pada kolom dan baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata ( $p < 0,05$ ).

**Tabel 7.** Kepadatan Sel Vegetatif *B. megaterium* Setiap Kombinasi Perlakuan ( $\times 10^9$  sel/ml) pada Waktu Inkubasi 10 Jam

Media (Tepung)	Dosis Karbon (g/L)				Rataan
	5	10	15	20	
Tapioka	0,05 $\pm$ 0,00	0,06 $\pm$ 0,00	0,08 $\pm$ 0,00	0,07 $\pm$ 0,00	0,07 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>
Terigu	1,20 $\pm$ 0,00	1,50 $\pm$ 0,00	1,70 $\pm$ 0,00	1,60 $\pm$ 0,00	1,50 $\pm$ 0,22 <sup>c</sup>
Jagung	0,03 $\pm$ 0,06	0,04 $\pm$ 0,05	0,03 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,05	0,03 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>
<b>Rataan</b>	0,43 $\pm$ 0,67 <sup>a</sup>	0,53 $\pm$ 0,84 <sup>b</sup>	0,60 $\pm$ 0,94 <sup>d</sup>	0,57 $\pm$ 0,95 <sup>c</sup>	

Keterangan: Huruf yang berbeda pada kolom dan baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata ( $p < 0,05$ ).

**Tabel 8.** Kepadatan Sel Vegetatif *B. megaterium* Setiap Kombinasi Perlakuan ( $\times 10^9$  sel/ml) pada Waktu Inkubasi 18 Jam

Media (Tepung)	Dosis Karbon (g/L)				Rataan
	5	10	15	20	
Tapioka	0,05 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,00	0,07 $\pm$ 0,00	0,06 $\pm$ 0,00	0,06 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>
Terigu	1,00 $\pm$ 0,00	1,30 $\pm$ 0,00	1,50 $\pm$ 0,00	0,55 $\pm$ 0,10	1,09 $\pm$ 0,41 <sup>c</sup>
Jagung	0,04 $\pm$ 0,00	0,05 $\pm$ 0,00	0,06 $\pm$ 0,00	0,07 $\pm$ 0,00	0,05 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
<b>Rataan</b>	0,36 $\pm$ 0,55 <sup>b</sup>	0,47 $\pm$ 0,72 <sup>c</sup>	0,54 $\pm$ 0,83 <sup>d</sup>	0,23 $\pm$ 0,28 <sup>a</sup>	

Keterangan: Huruf yang berbeda pada kolom dan baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata ( $p < 0,05$ ).

Sel vegetatif yang ditumbuhkan pada media tepung terigu dosis 15 g/L pada waktu 5 jam memiliki nilai 394% dan 750% lebih tinggi jika dibandingkan dosis 15 g/L pada tepung tapioka dan tepung jagung secara berurutan. Pada waktu 10 jam, sel vegetatif pada dosis 15 g/L meningkat 88% dan tetap memiliki nilai tertinggi jika dibandingkan dengan perlakuan lain, akan tetapi pada waktu 18 jam kepadatan sel vegetatif menurun sebesar 113%. Kepadatan sel vegetatif pada tepung terigu memiliki nilai yang lebih besar dikarenakan kandungan karbon organik yaitu 8% dan 15% lebih tinggi jika dibandingkan dengan tepung tapioka dan tepung jagung secara berurutan (Tabel 5). Sumber karbon berperan penting dalam sintesis biomassa, sumber energi, pemeliharaan sel dan produksi enzim mikroba (Borah, *et al.*, 2002; Cheba, *et al.*, 2017; Wu, *et al.*, 2019). Selain itu, sumber karbon yang berbeda juga berpengaruh pada jalur pusat metabolik yaitu



siklus *tricarboxylic acid* (TCA) pada bakteri aerob. Siklus ini berperan dalam mengoksidasi *acetyl*-CoA dalam berbagai substrat dan mempengaruhi prekursor dalam sintesis asam amino yang terdapat pada media kultur (Vandenbergh, *et al.*, 1999; Meylan, *et al.*, 2017).

Sumber karbon alternatif lain yang telah dilakukan penelitian yaitu berasal dari tepung kedelai dan susu kedelai yang berfungsi sebagai nutrisi organik dari produk pertanian lokal menghasilkan kepadatan sel vegetatif sebesar  $4,8 \times 10^4$  cfu/ml dan  $4,1 \times 10^4$  cfu/ml (Agwa dan Ossai-Chidi, 2016). Selain sumber dan dosis karbon, C/N rasio juga mempengaruhi hasil kepadatan bakteri *B. megaterium*.

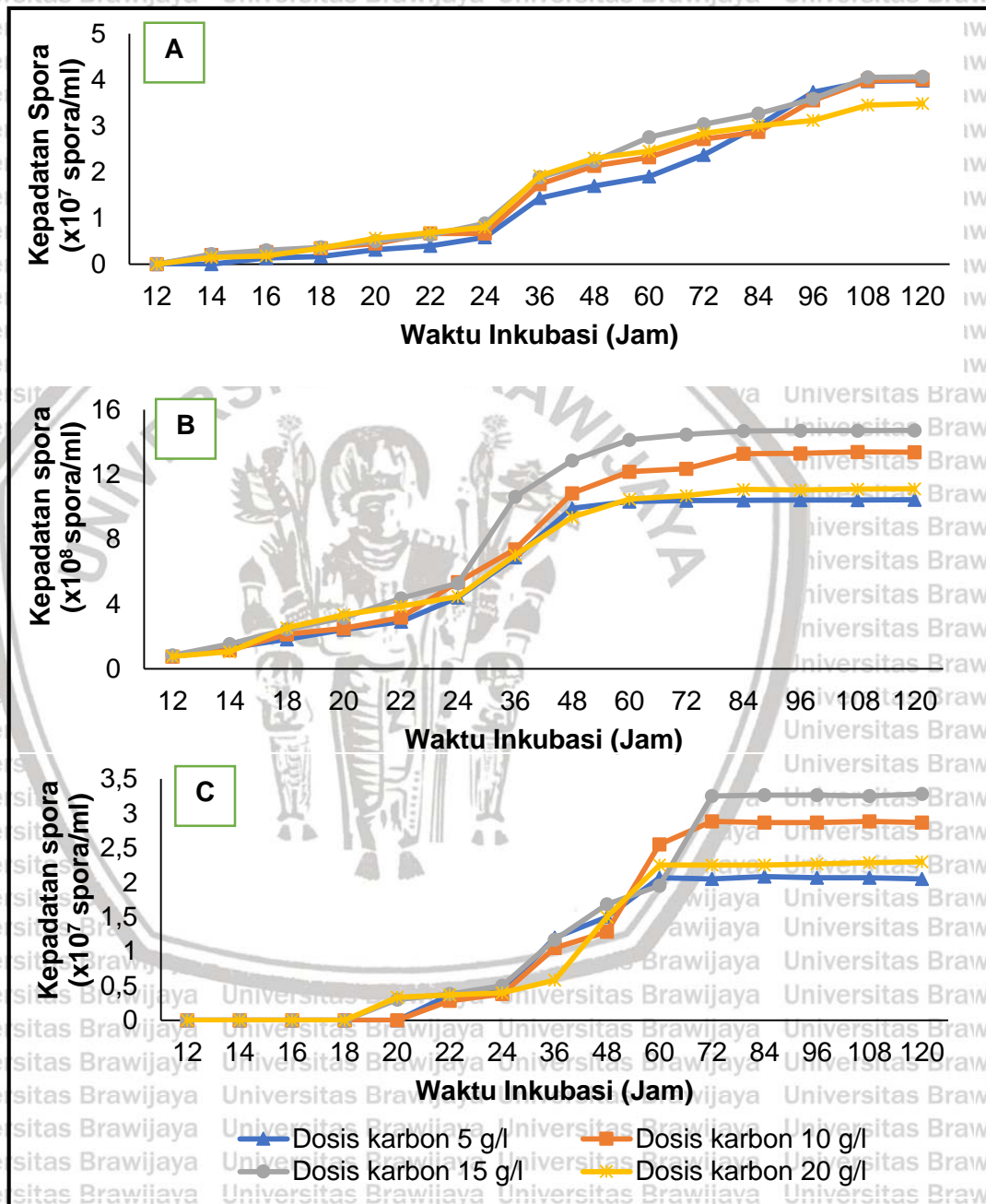
Penelitian ini menggunakan rasio C/N 5:1 di semua perlakuan dengan dosis karbon yang berbeda pada setiap media uji yang digunakan. Faktor rasio C/N sangat berpengaruh pada pertumbuhan sel vegetatif ketika nitrogen dijadikan sebagai faktor pembatas yang nantinya berdampak terhadap peningkatan kepadatan bakteri (Gusewell and Gessner, 2009).

### 5.1.2 Kepadatan Spora

Spora yang terbentuk sebagai upaya pertahanan diri sel vegetatif terhadap perubahan lingkungan yang kurang mendukung kehidupannya. Kepadatan spora akan bertambah selama nutrisi di lingkungan kultur masih belum stabil atau belum tersedianya nutrisi baru untuk spora sebagai upaya germinasi (Gaupry, *et al.*, 2019). Pola pertumbuhan spora *B. megaterium* pada penelitian ini dengan menggunakan sumber dan dosis karbon yang berbeda disajikan pada Gambar 17.

Kepadatan spora pada penelitian ini diamati melalui fase pertumbuhan yaitu fase adaptasi, fase eksponensial dan fase stasioner. Fase lag dengan waktu terlalu lama terjadi di tepung jagung yaitu selama 18 jam yang menunjukkan produksi spora yang terbentuk membutuhkan waktu yang lebih lama jika dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Kemudian setelah melewati fase lag, kepadatan spora mulai meningkat secara bertahap hingga mencapai puncak eksponensial di waktu yang

berbeda pada setiap kombinasi perlakuan. Setelah itu, kepadatan spora di semua perlakuan mencapai fase stasioner sampai akhir waktu inkubasi. Umumnya, kepadatan spora akan terus meningkat sebanding dengan penurunan kepadatan sel vegetatif di media kultur (Carrera, *et al.*, 2008; Ubong, *et al.*, 2019).



**Gambar 17.** Fase Produksi Spora *B. megaterium* pada Media dan Dosis Karbon dalam Beberapa Waktu Inkubasi: A) Tepung Tapioka; B) Tepung Terigu; C) Tepung Jagung.

Spora muncul pertama kali pada jam ke-12 untuk tepung terigu dan tepung jagung serta menunjukkan waktu yang lebih cepat (2 jam) jika dibandingkan dengan tepung tapioka. Kepadatan spora pada seluruh perlakuan kombinasi media dan dosis karbon menunjukkan terjadinya peningkatan secara bertahap hingga mencapai puncak tertinggi serta memasuki fase stasioner sampai akhir fase sporulasi. Kepadatan sel vegetatif tertinggi tidak menjadi indikator tingginya produksi spora yang dihasilkan seperti pada tepung jagung memproduksi spora tertinggi pada dosis 15 g/L pada jam ke-108 ( $3,3 \times 10^7$  spora/ml) atau tidak pada dosis vegetatif tertinggi (20 g/L). Kondisi ini berbeda dengan hasil kepadatan spora tertinggi pada tepung terigu dan tepung tapioka tetap berada pada dosis vegetatif tertinggi 15 g/L yang dicapai pada waktu inkubasi 84 jam dengan produksi spora yang dihasilkan secara berturut-turut yaitu  $1,5 \times 10^9$  spora/ml dan  $4,1 \times 10^7$  spora/ml. Dosis karbon yang semakin tinggi pada media kultur dapat mempengaruhi ketersediaan karbon di lingkungan yang berdampak pada kehidupan bakteri. Ketersediaan unsur karbon (D-laktat dan glutamat) yang berlebih di lingkungan memiliki peranan penting untuk memulai proses sporulasi (de Vries, *et al.*, 2005; Rajput, *et al.*, 2014). Konsentrasi karbon di lingkungan yang kurang optimal untuk bakteri penghasil spora dapat menghambat beberapa enzim yang terlibat dalam proses sporulasi (Monteiro, *et al.*, 2005).

Berdasarkan hasil Two Way ANOVA (Lampiran 6) diketahui bahwa masing-masing perlakuan media dan dosis karbon yang berbeda memberikan pengaruh terhadap produksi spora *B. megaterium* ( $p < 0,05$ ). Selain itu, terdapat interaksi antara perlakuan media dan dosis karbon ( $p < 0,05$ ) yang menunjukkan bahwa perbedaan hasil produksi spora dipengaruhi oleh kedua faktor perlakuan tersebut. Selanjutnya untuk mengetahui perbedaan antar kombinasi perlakuan yang diberikan, dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan uji Duncan. Hasil uji Duncan menunjukkan bahwa kombinasi perlakuan media dan

dosis karbon memberikan hasil rata-rata produksi spora pada rentang waktu tertentu yang berbeda nyata. Hasil uji Duncan kepadatan spora pada waktu inkubasi 36 jam, 84 jam dan 108 jam secara berturut-turut disajikan pada Tabel 9, 10 dan 11.

**Tabel 9.** Produksi Spora *B. megaterium* Setiap Kombinasi Perlakuan ( $\times 10^8$  spora/ml) pada Waktu Inkubasi 36 Jam

Media (Tepung)	Dosis Karbon (g/L)				Rataan
	5	10	15	20	
Tapioka	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>
Terigu	0,69 $\pm$ 0,01	0,74 $\pm$ 0,03	1,10 $\pm$ 0,00	0,70 $\pm$ 0,02	0,81 $\pm$ 0,20 <sup>b</sup>
Jagung	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>
<b>Rataan</b>	0,24 $\pm$ 0,39 <sup>a</sup>	0,26 $\pm$ 0,42 <sup>b</sup>	0,38 $\pm$ 0,63 <sup>c</sup>	0,24 $\pm$ 0,40 <sup>a</sup>	

Keterangan: Huruf yang berbeda pada kolom dan baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata ( $p < 0,05$ ).

**Tabel 10.** Produksi Spora *B. megaterium* Setiap Kombinasi Perlakuan ( $\times 10^9$  spora/ml) pada Waktu Inkubasi 84 Jam

Media (Tepung)	Dosis Karbon (g/L)				Rataan
	5	10	15	20	
Tapioka	0,03 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>
Terigu	1,03 $\pm$ 0,06	1,30 $\pm$ 0,00	1,50 $\pm$ 0,00	1,10 $\pm$ 0,00	1,23 $\pm$ 0,21 <sup>b</sup>
Jagung	0,02 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
<b>Rataan</b>	0,36 $\pm$ 0,58 <sup>a</sup>	0,45 $\pm$ 0,73 <sup>c</sup>	0,52 $\pm$ 0,85 <sup>d</sup>	0,38 $\pm$ 0,62 <sup>b</sup>	

Keterangan: Huruf yang berbeda pada kolom dan baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata ( $p < 0,05$ ).

**Tabel 11.** Produksi *B. megaterium* Setiap Kombinasi Perlakuan ( $\times 10^9$  spora/ml) pada Waktu Inkubasi 108 Jam

Media (Tepung)	Dosis Karbon (g/L)				Rataan
	5	10	15	20	
Tapioka	0,04 $\pm$ 0,00	0,04 $\pm$ 0,00	0,04 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,00	0,04 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
Terigu	1,03 $\pm$ 0,06	1,33 $\pm$ 0,06	1,50 $\pm$ 0,00	1,10 $\pm$ 0,00	1,24 $\pm$ 0,22 <sup>b</sup>
Jagung	0,02 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>
<b>Rataan</b>	0,36 $\pm$ 0,58 <sup>a</sup>	0,47 $\pm$ 0,75 <sup>b</sup>	0,52 $\pm$ 0,84 <sup>c</sup>	0,39 $\pm$ 0,62 <sup>a</sup>	

Keterangan: Huruf yang berbeda pada kolom dan baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata ( $p < 0,05$ ).

Produksi spora *B. megaterium* pada waktu inkubasi 36, 84 dan 108 jam menunjukkan kepadatan spora yang berbeda-beda setiap perlakuan uji. Perbedaan kecepatan waktu kemunculan spora bakteri dipengaruhi oleh

kemampuan sel vegetatif untuk mempertahankan diri pada kondisi lingkungan yang kurang menguntungkan. Menurut Bressuire-Isoard, *et al.* (2018), perbedaan kecepatan waktu munculnya spora dipengaruhi oleh ketersediaan nutrisi pada media kultur. Upaya yang dilakukan untuk mempercepat proses sporulasi yaitu dengan pencapaian fase stasioner sel vegetatif yang lebih cepat, dengan demikian proses sporulasi dapat terjadi dalam waktu yang lebih cepat (Diaz-Garcia, *et al.*, 2010). Pemanfaatan produk lokal pertanian dapat digunakan sebagai media alternatif untuk menghasilkan spora bakteri dengan harga yang terjangkau.

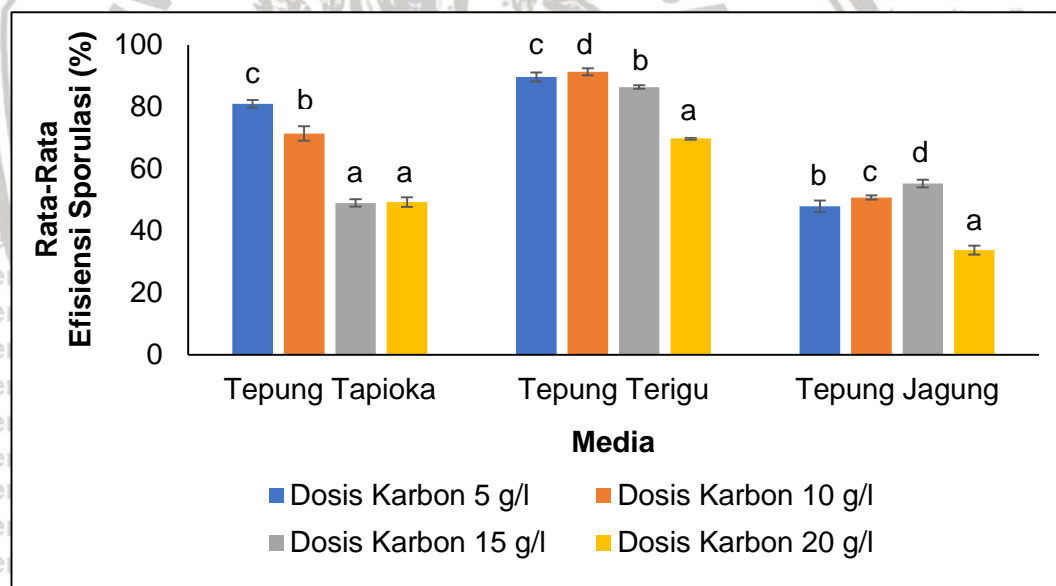
Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa media yang terdiri dari tepung kedelai, pati dan garam mineral dapat menghasilkan spora *B. thuringiensis* BTA sebesar  $1,51 \times 10^8$  spora/ml (Shojaaddini, *et al.*, 2010). Perbedaan kepadatan spora bakteri yang dihasilkan dengan penelitian ini dapat disebabkan oleh strain bakteri dan media tumbuh yang digunakan berbeda (Ren, *et al.*, 2018; Posada-Uribe, *et al.*, 2015).

Kepadatan spora tertinggi pada waktu 36, 84 dan 108 jam didapatkan pada tepung terigu dengan dosis 15 g/L dan memiliki nilai 50 kali lebih besar dibandingkan dengan tepung jagung dan 37,5 lebih besar dari tepung tapioka pada jam ke-108. Kandungan bahan organik yang tinggi pada tepung terigu (Tabel 5) mempengaruhi tingginya hasil kepadatan spora yang didapat jika dibandingkan dengan perlakuan lain. Menurut Fichtel, *et al.* (2008), kandungan bahan organik pada suatu media akan mempengaruhi stimulasi spora yang dihasilkan. Kondisi ini berhubungan dengan aktivasi regulator *Spo0A* yang terjadi ketika kandungan bahan organik pada suatu media menurun. Regulator transkripsional *Spo0A* berperan dalam proses transisi dari pertumbuhan vegetatif menuju proses sporulasi. Aktivasi transkripsi *Spo0A* melalui sistem "*phosphorelay*" yang diatur oleh histidin kinase yang mengalami autofosforilasi (KinA-KinE) untuk merespon perbedaan stres lingkungan. Regulasi aktivitas kinase dan fosfatase menentukan

tingkat *Spo0A* untuk memulai proses sporulasi (Garti-Levi, *et al.*, 2013; Tan dan Ramamurthi, 2014). *Spo0A* kemudian mengatur ekspresi sekitar 121 gen salah satunya untuk proses sporulasi (Molle, *et al.*, 2003).

### 5.1.3 Efisiensi Sporulasi

Efisiensi sporulasi dihitung setelah mendapatkan kepadatan sel vegetatif dan spora tertinggi pada setiap kombinasi media dan dosis karbon uji. Perhitungan dilakukan berdasarkan persentase perbandingan jumlah spora maksimal yang dihasilkan dari proses sporulasi dengan vegetatif tertinggi untuk mengetahui seberapa efisien persentase transisi yang didapat. Perlakuan kombinasi media dan dosis karbon yang diberikan menunjukkan perbedaan hasil rerata efisiensi sporulasi *B. megaterium* (Gambar 18). Hasil efisiensi sporulasi menjadi indikator keberhasilan dari proses sporulasi.



**Gambar 18.** Rata-rata Efisiensi Sporulasi *Bacillus megaterium* pada Kombinasi Perlakuan Media dan Dosis Karbon

Berdasarkan data grafik di atas setelah dilakukan pengujian Two Way Anova (Lampiran 6) dapat diketahui bahwa kombinasi perlakuan media dan dosis karbon yang berbeda memberikan pengaruh terhadap rata-rata efisiensi sporulasi *B. megaterium* ( $p < 0,05$ ). Selanjutnya untuk mengetahui perbedaan antar kombinasi perlakuan yang diberikan, dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil

(BNT) dengan uji Duncan. Hasil uji Duncan menunjukkan bahwa masing-masing kombinasi perlakuan antara media dan dosis karbon memberikan hasil rata-rata efisiensi sporulasi yang berbeda nyata. Perbedaan media kultur dalam proses sporulasi memberikan pengaruh terhadap efisiensi sporulasi yang dihasilkan dan telah dilaporkan oleh beberapa peneliti yaitu setiap strain bakteri yang digunakan akan membutuhkan komponen nutrisi dan kondisi media optimum yang berbeda untuk mendukung pertumbuhannya (Monteiro, *et al.*, 2005; Cho, *et al.*, 2009).

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan yaitu kandungan glutamat yang terdapat pada media kultur bersifat menguntungkan untuk pertumbuhan *B. cereus* pada kisaran optimal akan tetapi menjadi penghambat pada *Bacillus* lain (Buhr, *et al.*, 2008). Selain itu, penambahan garam mineral (Ca, Mn, Mg, Fe dan Zn) pada media kultur merupakan elemen penting dalam pembentukan lapisan spora akan tetapi pada konsentrasi yang berlebih dapat menghambat pertumbuhan dari spora bakteri (Hageman, *et al.*, 1984; Cho, *et al.*, 2009).

Hasil rata-rata efisiensi sporulasi *B. megaterium* tertinggi yaitu pada media tepung terigu dengan dosis karbon 10 g/L (91,30%), hasil ini menunjukkan nilai efisiensi sporulasi 10% lebih besar dari perlakuan tertinggi tepung tapioka pada dosis karbon 5 g/L. Selain itu, efisiensi tertinggi pada media tepung terigu juga menunjukkan nilai 2x lebih besar dari perlakuan tepung jagung di semua dosis karbon yang diberikan. Hasil efisiensi sporulasi yang berbeda pada setiap media disebabkan karena kandungan bahan dan dosis karbon yang berbeda. Tepung tapioka, tepung terigu dan tepung jagung merupakan produk pertanian yang memiliki harga terjangkau, mudah di temukan dan memiliki karbon organik lebih dari 35% (Tabel 5). Berdasarkan hasil pengujian bahan organik yang terkandung pada media, tepung terigu memiliki konsentrasi karbon dan nitrogen yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan media lainnya. Kondisi ini mempengaruhi produksi sel vegetatif yang bertransisi menjadi spora *B. megaterium* memiliki kepadatan

yang tinggi jika dibandingkan dengan perlakuan lainnya yang berpengaruh terhadap hasil efisiensi sporulasi yang didapat. Pemilihan media tumbuh spora harus memperhatikan kandungan nutrisi dari media seperti karbon, nitrogen dan makronutrien yang terlibat dalam proses pertumbuhan, produksi spora, dan sintesis metabolit dari spesies *Bacillus* (Gouda, *et al.*, 2001; Yan, *et al.*, 2007).

Hasil penelitian ini menunjukkan nilai efisiensi sporulasi yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan hasil penelitian Ananthanarayanan dan Dubhashi (2016) yang hanya mendapatkan efisiensi sporulasi *Bacillus aerius* 38,6% yang ditumbuhkan pada media DSM. Selain itu, nilai efisiensi sporulasi penelitian ini 60% lebih tinggi jika dibandingkan penelitian Omer (2010) yang menumbuhkan *Bacillus* pada media yang diperkaya dengan garam mineral. Perbedaan hasil efisiensi sporulasi disebabkan perbedaan kemampuan bakteri dalam melakukan proses penyerapan nutrisi yang tersedia di media kultur. Perbedaan lokasi isolasi suatu bakteri juga mempengaruhi efisiensi sporulasi yang dihasilkan yang berhubungan dengan karakter bakteri yang ditumbuhkan pada media optimal dalam kondisi laboratorium (Piccirillo dan Honigberg, 2010).

Nilai vegetatif dan spora tertinggi yang di dapat pada penelitian ini (media tepung terigu dosis 15 g/L) tidak diikuti dengan nilai efisiensi sporulasi yang tinggi jika dibandingkan dengan media tepung terigu dosis 10 g/L. Faktor penghambat sel vegetatif dalam membentuk spora yang berpengaruh terhadap rendahnya efisiensi sporulasi yang dihasilkan telah dievaluasi oleh beberapa peneliti.

Peningkatan efisiensi sporulasi *B. coagulans* dapat dilakukan dengan cara menambahkan karbohidrat, garam mineral dan pengaturan pH di media kultur (Uono *et al.*, 2019). Selain berkurangnya nutrisi seperti fosfor dan sumber karbon di media kultur, mineral juga memiliki peranan penting dalam proses sporulasi *Bacillus* seperti manganese ( $Mn^{2+}$ ) dan kalsium ( $Ca^{2+}$ ). Kalsium berperan sebagai komponen pembentuk CaDPA (kalsium dipicolinate) yang merupakan kalsium



chelate (kalsium yang mudah diserap tubuh) yang berasal dari asam dipikolinik (2,6 pyridine dicarboxylic acid) dan merupakan komposisi utama dalam endospora (5-15% dari berat molekulnya) (Amaha dan Ordal, 1957; Sinnela, *et al.*, 2019).

#### 5.1.4 Laju Pertumbuhan dan Waktu Generasi Sel Vegetatif

Pertumbuhan maksimum setiap spesies bakteri didapatkan pada waktu yang berbeda-beda bergantung pada strain, habitat hidupnya dan kesesuaian terhadap media tumbuh baru (Vartoukian, 2016). Pertumbuhan sel vegetatif dapat diamati melalui media padat atau cair. Media memiliki peranan penting dalam menyediakan kebutuhan nutrisi untuk bakteri dan menjaga metabolisme bakteri pada lingkungan kultur (Boddy dan Wimpenny, 1992; Stecchini, *et al.*, 2000). Selain pertumbuhan maksimum, waktu generasi juga merupakan faktor penting sebagai kemampuan membelah dari sel bakteri dalam satuan waktu tertentu (Muller-Delignette, *et al.*, 1998). Umumnya pertumbuhan bakteri dan waktu generasi memiliki hubungan yang berbanding lurus dan saling berkaitan. Semakin tinggi perbedaan pertumbuhan bakteri dari waktu ke waktu maka waktu generasi yang dihasilkan umumnya akan semakin cepat (Martin, *et al.*, 2003).

Berdasarkan hasil Two Way ANOVA dengan cara yang sama yang disajikan pada Lampiran 6, diketahui bahwa masing-masing perlakuan media dan dosis karbon yang berbeda memberikan pengaruh terhadap pertumbuhan *B. megaterium* ( $p < 0,05$ ). Selain itu, terdapat interaksi antara perlakuan media dan dosis karbon ( $p < 0,05$ ) yang menunjukkan bahwa perbedaan hasil laju pertumbuhan sel vegetatif dipengaruhi oleh kedua faktor perlakuan tersebut.

Selanjutnya untuk mengetahui perbedaan antar kombinasi perlakuan yang diberikan, dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan uji Duncan.

Hasil uji Duncan menunjukkan bahwa kombinasi perlakuan media dan dosis karbon memberikan hasil laju pertumbuhan sel vegetatif yang berbeda nyata. Hasil uji Duncan laju pertumbuhan bakteri *B. megaterium* disajikan pada Tabel 12.

**Tabel 12.** Pertumbuhan Sel Vegetatif *B. megaterium* Setiap Kombinasi Perlakuan

Media	Dosis (g/L)	Pertumbuhan Maksimum	Laju Pertumbuhan (/menit)	Waktu Generasi (menit)
Tepung Tapioka	5	2,13	28,80 <sup>a</sup>	85,94
	10	2,34	30,60 <sup>b</sup>	82,28
	15	2,77	31,80 <sup>d</sup>	76,82
	20	2,57	31,20 <sup>c</sup>	78,13
Tepung Terigu	5	5,41	43,20 <sup>a</sup>	58,04
	10	5,64	46,80 <sup>b</sup>	52,97
	15	5,77	48,00 <sup>d</sup>	48,52
	20	5,73	47,40 <sup>c</sup>	49,81
Tepung Jagung	5	2,03	27,00 <sup>a</sup>	92,41
	10	2,34	30,00 <sup>b</sup>	83,13
	15	2,35	30,00 <sup>b</sup>	81,44
	20	2,35	30,60 <sup>c</sup>	80,14

Keterangan: Huruf yang berbeda pada kolom dan baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata ( $p < 0,05$ )

Perbedaan laju pertumbuhan di setiap media tumbuh berbanding lurus dengan hasil waktu generasi. Semakin tinggi pertumbuhan, maka semakin cepat waktu generasi yang terjadi. Berdasarkan data tersebut, tepung terigu dengan dosis 15 g/L memiliki nilai laju pertumbuhan tertinggi yaitu 48 per menit dengan waktu generasi 48,52 menit. Ketersediaan bahan organik khususnya unsur karbon dari tepung terigu yang mencapai hampir 50% memberikan respon positif terhadap pertumbuhan sel vegetatif *B. megaterium* jika dibandingkan dengan perlakuan lain.

Penyerapan karbon di lingkungan sebagai sumber nutrisi bakteri dapat meningkatkan biomassa sel dalam upaya melakukan pembelahan pada waktu tertentu. Menurut Gibson, *et al.* (2018), setiap spesies bakteri mempunyai waktu generasi yang berbeda seperti *Salmonella enterica* mempunyai waktu generasi 30 menit dan *Vibrio* 39 menit. Penelitian Yuniarti, *et al.* (2019), menumbuhkan *Bacillus* sp. pada media glukosa menunjukkan maksimum *growth rate* sekitar 48 – 60 per menit pada C/N rasio yang berbeda dengan waktu generasi berkisar antara 41,7 – 52,6 menit. Perbedaan hasil *growth rate* dan waktu generasi dipengaruhi oleh perbedaan spesies dan media kultur yang digunakan untuk pertumbuhan bakteri.

Wang, *et al.* (2019) menambahkan, sumber karbon yang tersedia di lingkungan

akan di absorpsi oleh sel bakteri yang berfungsi sebagai substrat jaringan metabolik sel. Selanjutnya akan menyediakan asam amino dan komponen lain yang mendukung perkembangan sel bakteri.

#### 5.1.5 Laju Pertumbuhan Spora

Pertumbuhan spora *B. megaterium* mulai diamati ketika sel vegetatif mulai memproduksi spora yang disebabkan oleh kondisi lingkungan yang kurang mendukung pertumbuhannya (Soni, *et al.*, 2016; Gauvry, *et al.*, 2019). Beberapa faktor yang menyebabkan sel vegetatif mengalami stres yaitu konsentrasi nutrisi yang mulai menurun, pH dan suhu ekstrim. Laju pertumbuhan spora dicapai ketika populasi spora berada pada fase puncak eksponensial pada durasi waktu tertentu (Wunderlin, *et al.*, 2016). Pengamatan laju pertumbuhan spora bertujuan untuk mengetahui pertumbuhan rata-rata spora tertinggi yang dipengaruhi oleh besaran transisi sel vegetatif dalam memproduksi spora *B. megaterium*. Berbeda dengan sel vegetatif, waktu generasi spora *B. megaterium* tidak dapat dihitung karena spora bakteri tidak mengalami proses pembelahan sel. Spora dihasilkan dari sel vegetatif tunggal.

Berdasarkan hasil Two Way ANOVA dengan cara yang sama seperti yang disajikan pada Lampiran 6, diketahui bahwa masing-masing perlakuan media dan dosis karbon yang berbeda memberikan pengaruh terhadap laju pertumbuhan spora *B. megaterium* ( $p < 0,05$ ). Selain itu, terdapat interaksi antara perlakuan media dan dosis karbon ( $p < 0,05$ ) yang menunjukkan bahwa perbedaan laju pertumbuhan spora yang dipengaruhi oleh kedua faktor perlakuan tersebut.

Selanjutnya untuk mengetahui perbedaan antar kombinasi perlakuan yang diberikan, dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan uji Duncan.

Hasil uji Duncan menunjukkan bahwa kombinasi perlakuan media dan dosis karbon memberikan hasil rata-rata laju pertumbuhan spora pada rentang waktu

tertentu yang berbeda nyata. Hasil uji Duncan laju pertumbuhan spora *B. megaterium* disajikan pada Tabel 13.

**Tabel 13.** Laju Pertumbuhan Spora Bakteri *B. megaterium* Setiap Kombinasi Perlakuan

Media	Dosis (g/L)	Laju pertumbuhan (/menit)
Tepung Tapioka	5	19,20±0,02 <sup>b</sup>
	10	19,20±0,01 <sup>b</sup>
	15	21,00±0,01 <sup>c</sup>
	20	16,80±0,00 <sup>a</sup>
Tepung Terigu	5	30,00±0,01 <sup>a</sup>
	10	33,00±0,02 <sup>b</sup>
	15	40,80±0,01 <sup>d</sup>
	20	37,80±0,02 <sup>c</sup>
Tepung Jagung	5	17,40±0,01 <sup>a</sup>
	10	18,60±0,00 <sup>b</sup>
	15	19,80±0,02 <sup>c</sup>
	20	17,40±0,01 <sup>a</sup>

Keterangan: Huruf yang berbeda pada kolom dan baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata ( $p < 0,05$ )

Perbedaan sumber dan dosis karbon pada penelitian ini berpengaruh terhadap *growth rate* spora *B. megaterium* yang dihasilkan. Hasil menunjukkan bahwa data berbanding lurus dengan hasil laju pertumbuhan sel vegetatif, pada spora juga menunjukkan nilai tertinggi pada media tepung terigu dengan dosis 15 g/L (40,80 /menit) bahkan 2 kali lebih tinggi dari media tepung tapioka dan tepung jagung. Sumber karbon berperan penting dalam proses terbentuknya spora yang mempengaruhi enzim yang terlibat dalam proses sporulasi. Faktor utama yang mempengaruhi tingginya laju pertumbuhan spora yaitu konsentrasi sel vegetatif di media kultur (Dawes and Thornley, 1970). Kondisi ini berarti pertumbuhan spora akan bertambah sejalan dengan semakin banyaknya produksi spora yang dihasilkan oleh sel vegetatif. Selain itu, mineral yang ditambahkan juga mempengaruhi pertumbuhan spora ketika ditumbuhkan dan dioptimasi pada media sporulasi (Mah, *et al.*, 2008).

## 5.2 Tahap 2

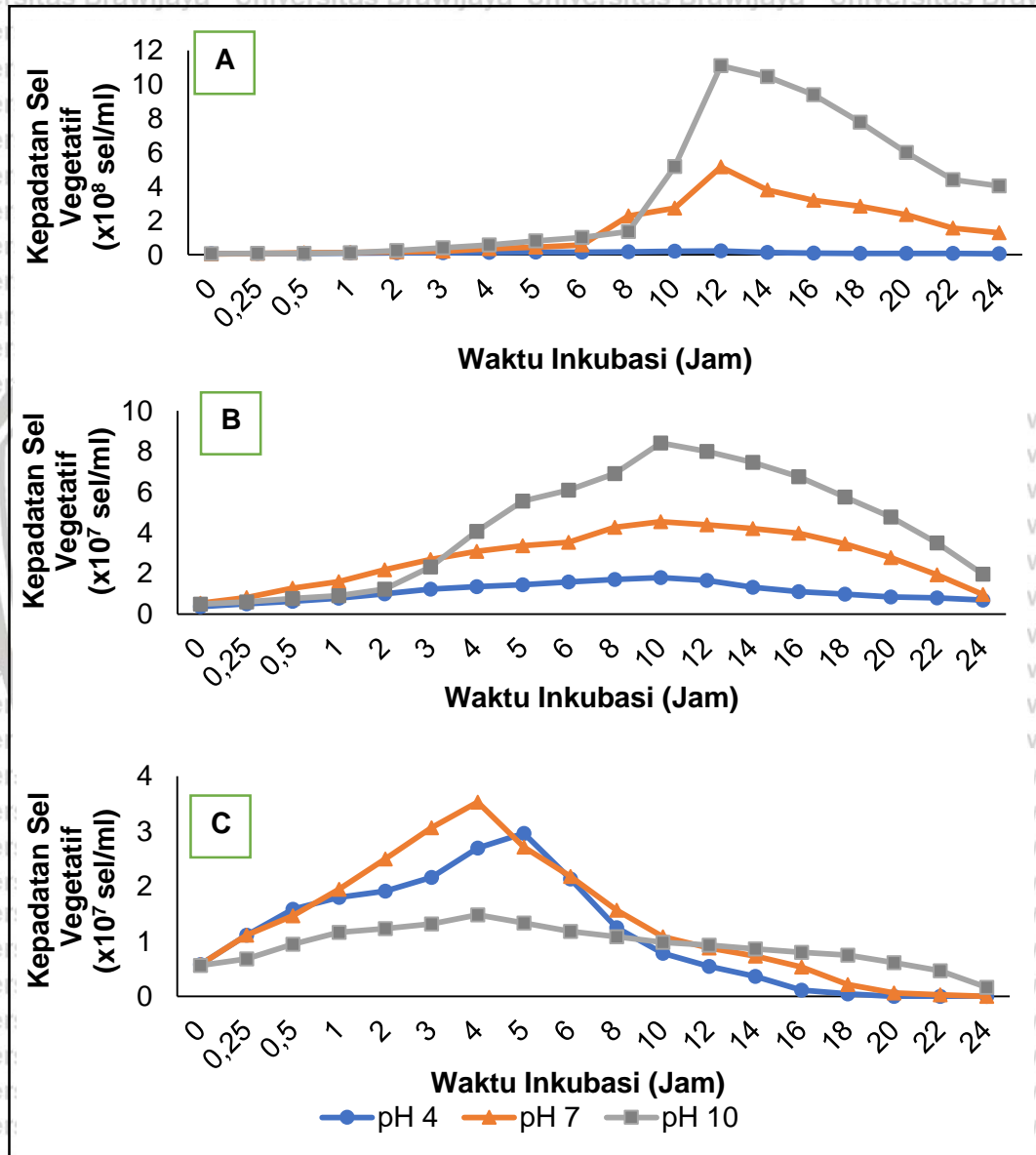
Setelah mendapatkan sumber dan dosis karbon terbaik yaitu tepung terigu dengan dosis 15 g/L yang ditunjukkan dari hasil uji statistic yaitu memiliki kepadatan spora yang berbeda sangat nyata dengan perlakuan lainnya, maka penelitian dilanjutkan dengan perbedaan suhu dan pH untuk mendapatkan optimasi lingkungan untuk produksi spora *B. megaterium*. Suhu yang digunakan pada penelitian ini yaitu 37 °C, 44 °C dan 51 °C sedangkan pH yang digunakan yaitu pH 4, 7 dan 10.

### 5.2.1 Kepadatan Sel Vegetatif

Pertumbuhan sel vegetatif dengan kombinasi perlakuan suhu dan pH menunjukkan bahwa terdapat perbedaan waktu inkubasi untuk mencapai fase pertumbuhan bakteri. Pola pertumbuhan sel vegetatif *B. megaterium* pada perbedaan optimasi lingkungan disajikan pada Gambar 19. Kepadatan sel vegetatif diamati berdasarkan fase pertumbuhan yang terdiri dari fase lag, fase eksponensial, fase stasioner dan fase kematian. Hasil sel vegetatif *B. megaterium* dengan berbagai waktu pengambilan sampel menunjukkan hasil kepadatan sel vegetatif yang berbeda-beda. Pola pertumbuhan dari semua kombinasi perlakuan menunjukkan tren grafik yang hampir sama, meskipun tidak menunjukkan adanya fase stasioner yang teramati pada penelitian ini.

Fase lag merupakan tahapan penyesuaian diri bakteri pada media tumbuh baru dengan waktu tercepat terjadi pada menit ke-7 pada suhu 37°C dengan pH 10. Pertumbuhan sel vegetatif secara bertahap meningkat hingga mencapai puncak eksponensial pada jam ke-12 untuk suhu 37 °C dan jam ke-10 untuk suhu 44 °C pada semua perbedaan pH yang diberikan. Akan tetapi, pada suhu 51 °C, puncak eksponensial terjadi lebih cepat yaitu pada waktu inkubasi 4 jam pada pH 7 dan 10. Fase stasioner tidak terjadi pada semua perlakuan yang mungkin dicapai

selama selang waktu 1 jam pada suhu 37 °C dan 44 °C serta selang waktu 30 menit pada suhu 51 °C yang tidak teramati pada penelitian ini. Setelah melewati fase stasioner, kepadatan sel vegetatif menurun hingga akhir dari waktu inkubasi yang tidak hanya disebabkan karena nutrisi di lingkungan yang berkurang tetapi juga adanya pengaruh stres lingkungan.



**Gambar 19.** Pertumbuhan Sel Vegetatif di Bawah Perbedaan Suhu dan pH dalam Beberapa Waktu Inkubasi: A) Suhu 37 °C, B) Suhu 44 °C dan C) Suhu 51 °C

Setiap fase pertumbuhan yang diamati pada masing-masing kombinasi perlakuan suhu dan pH pada penelitian ini menunjukkan adanya perbedaan durasi

waktu untuk mencapai fase pertumbuhan tersebut. Pada suhu 37 °C dan 44 °C membutuhkan waktu yang relatif lebih lama untuk melewati fase eksponensial jika dibandingkan suhu 51°C di semua perbedaan pH yang diberikan. Menurut Desai dan Varadaraj (2010), pemberian suhu panas akan mempengaruhi status fisiologi spesies bakteri dan komponen nutrisi pada media tumbuh. Populasi sel bakteri yang hidup pada suhu yang tinggi dapat berkurang 90% dalam beberapa waktu yang singkat. Kelebihan bakteri penghasil spora akan dapat bertahan pada suhu ekstrim dengan melakukan transisi menjadi spora sebagai upaya perlawanan terhadap kondisi lingkungan yang kurang mendukung kehidupannya (Lovdal, et al., 2011; Cebrian, et al., 2017). Sehingga pada jam ke-6 pada suhu 51°C di semua perbedaan pH, spora *B. megaterium* telah dihasilkan.

Kepadatan sel vegetatif mencapai puncak tertinggi pada masing-masing media secara berturut-turut yaitu pada pH 10 di suhu 37 °C ( $1,1 \times 10^9$  sel/ml) dan 44 °C ( $8,5 \times 10^7$  sel/ml) sedangkan pH 7 pada suhu 51 °C ( $3,7 \times 10^7$  sel/ml). Suhu dan pH merupakan faktor fisika yang berperan penting dalam mempengaruhi produksi biomasa dari sel vegetatif (Singh, et al., 2014). Perbedaan spesies dan media kultur akan mempengaruhi parameter faktor fisika yang dibutuhkan untuk mendapatkan pertumbuhan maksimum dari bakteri. Beberapa penelitian mengenai perbedaan suhu dan pH pada spesies lain yang membedakan dengan penelitian ini yaitu *Tricoderma* sp. menunjukkan optimasi lingkungan terbaik yaitu pada pH 5,5 dan suhu 30 °C pada media kultur MSM (Verdin, et al., 2004; Santos, et al., 2004). Penelitian lain menunjukkan bahwa strain *Clostridium butyricum* tumbuh optimal pada suhu 37°C dengan pH 4,8 (Anniballi, et al., 2002).

Berdasarkan hasil Two Way ANOVA dengan cara yang sama seperti pada Lampiran 6, diketahui bahwa masing-masing perlakuan suhu dan pH yang berbeda memberikan pengaruh terhadap kepadatan *B. megaterium* ( $p < 0,05$ ). Selain itu, terdapat interaksi antara perlakuan media dan dosis karbon ( $p < 0,05$ )

yang menunjukkan bahwa perbedaan kepadatan sel vegetatif dipengaruhi oleh kedua faktor tersebut. Selanjutnya untuk mengetahui perbedaan antar kombinasi perlakuan yang diberikan, dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan uji Duncan. Hasil uji Duncan menunjukkan bahwa kombinasi perlakuan suhu dan pH memberikan kepadatan sel vegetatif yang berbeda nyata. Hasil uji Duncan kepadatan vegetatif *B. megaterium* disajikan pada Tabel 14, 15 dan 16.

**Tabel 14.** Kepadatan Sel Vegetatif di Bawah Perbedaan Suhu dan pH pada Waktu Inkubasi 4 jam ( $\times 10^7$  sel/ml)

Suhu (°C)	pH			Rataan
	4	7	10	
37	1,37±0,06	3,57±0,06	5,67±0,21	3,53±2,15 <sup>c</sup>
44	1,37±0,06	3,10±0,10	4,10±0,10	2,86±1,38 <sup>b</sup>
51	2,73±0,12	3,53±0,15	1,50±0,10	2,59±1,02 <sup>a</sup>
<b>Rataan</b>	1,82±0,79 <sup>a</sup>	3,40±0,26 <sup>b</sup>	3,76±2,10 <sup>c</sup>	

Keterangan: Huruf yang berbeda pada kolom dan baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata ( $p < 0,05$ ).

**Tabel 15.** Kepadatan Sel Vegetatif di Bawah Perbedaan Suhu dan pH pada Waktu Inkubasi 12 jam ( $\times 10^9$  sel/ml)

Suhu (°C)	pH			Rataan
	4	7	10	
37	0,02±0,00	0,52±0,01	1,10±0,00	0,55±0,03 <sup>c</sup>
44	0,02±0,00	0,04±0,00	0,08±0,00	0,05±0,03 <sup>b</sup>
51	0,04±0,03	0,04±0,05	0,01±0,00	0,03±0,02 <sup>a</sup>
<b>Rataan</b>	0,02±0,01 <sup>a</sup>	0,20±0,28 <sup>b</sup>	0,40±0,61 <sup>c</sup>	

Keterangan: Huruf yang berbeda pada kolom dan baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata ( $p < 0,05$ ).

**Tabel 16.** Kepadatan Sel Vegetatif di Bawah Perbedaan Suhu dan pH pada Waktu Inkubasi 20 jam ( $\times 10^8$  sel/ml)

Suhu (°C)	pH			Rataan
	4	7	10	
37	0,08±0,00	2,37±0,06	6,00±0,10	2,81±0,00 <sup>c</sup>
44	0,09±0,01	0,28±0,02	0,48±0,02	0,28±0,20 <sup>b</sup>
51	0,00±0,00	0,01±0,00	0,06±0,01	0,02±0,00 <sup>a</sup>
<b>Rataan</b>	0,05±0,39 <sup>a</sup>	0,89±0,42 <sup>b</sup>	2,18±0,63 <sup>c</sup>	

Keterangan: Huruf yang berbeda pada kolom dan baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata ( $p < 0,05$ ).

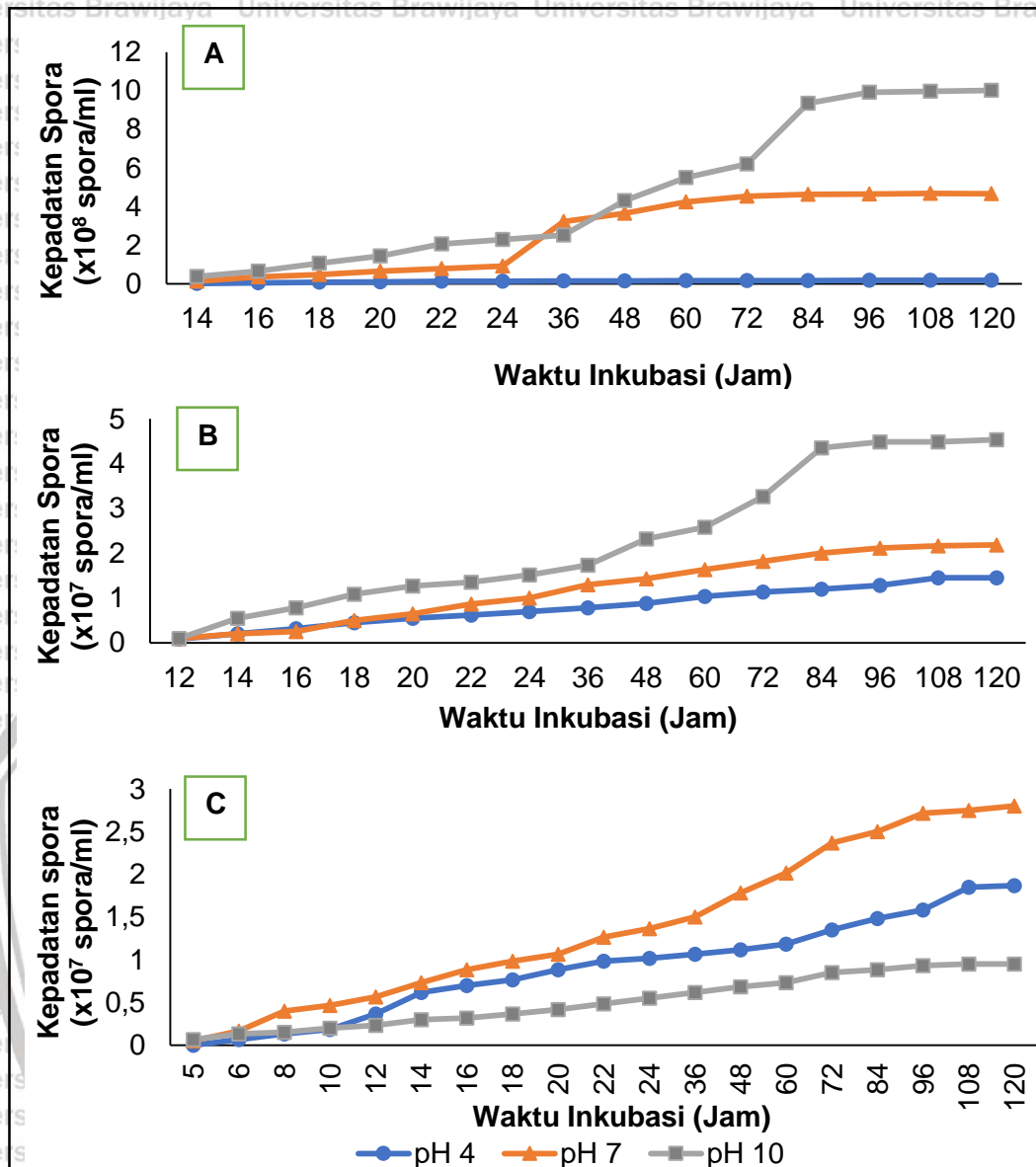
Optimasi suhu sel vegetatif *B. megaterium* pada waktu inkubasi 4, 12 dan 20 jam menunjukkan kepadatan sel vegetatif tertinggi pada suhu 37 °C dengan pH



10. Setiap jenis spesies bakteri mempunyai batas optimum untuk tumbuh yang tidak bisa disamakan dengan bakteri lainnya (Ratkowsky, 2016). Suhu akan mempengaruhi sel bakteri termasuk beberapa jenis proses fisiologi (Isnawati dan Trimulyono, 2018). Selain itu, faktor yang mempengaruhi pertumbuhan sel vegetatif yaitu pH. Derajat keasaman di lingkungan mempengaruhi aktivitas dan stabilitas yang berhubungan dengan pertumbuhan dan metabolisme dari mikroorganisme (Koni, *et al.*, 2017). Penelitian *Bacillus subtilis* sebelumnya menunjukkan bahwa suhu optimal untuk pertumbuhannya yaitu 37 °C dan pH 7, meskipun memiliki suhu optimal yang sama, pH dari hasil peneliti ini berbeda dengan pH optimal pada penelitian ini (pH 10) (Iqbal dan Rahman, 2017).

### 5.2.2 Kepadatan Spora

Produksi spora yang dihasilkan pada berbagai perbedaan suhu dan pH didapatkan ketika kondisi sel vegetatif mengalami stres karena perubahan lingkungan kultur (nutrisi menurun, pengaruh suhu dan pH). Pola produksi spora *B. megaterium* pada perbedaan suhu dan pH disajikan pada Gambar 20. Produksi spora pada penelitian ini diamati melalui fase pertumbuhan yaitu fase adaptasi, fase eksponensial dan fase stasioner. Penurunan produksi spora tidak teramati pada penelitian ini karena spora yang dihasilkan secara terus-menerus mengalami peningkatan dan menuju stasioner hingga waktu inkubasi 120 jam. Fase lag dari produksi spora *B. megaterium* yang dihasilkan dengan durasi waktu tercepat yaitu pada suhu 51°C hampir di semua perbedaan pH yaitu kurang dari 3 jam jika dibandingkan dengan perlakuan suhu dan pH yang lain. Kepadatan spora mulai mengalami peningkatan secara bertahap hingga mencapai puncak eksponensial dalam waktu yang berbeda-beda. Setelah itu, kepadatan spora *B. megaterium* di semua kombinasi perlakuan mencapai fase stasioner sampai akhir waktu inkubasi.



**Gambar 20.** Kepadatan Spora dibawah Perbedaan Suhu dan pH dengan Berbagai Waktu Pengambilan Sampel; A) Suhu 37 °C, B) Suhu 44 °C dan C) Suhu 51 °C.

Kemunculan spora *B. megaterium* pada suhu 51 didapati pada jam ke-5 yaitu 7 jam lebih cepat dibandingkan dengan suhu 37 °C dan 44 °C. Kepadatan spora tertinggi pada masing-masing suhu yaitu suhu 37 °C terdapat pada pH 10 ( $1 \times 10^9$  spora/ml), suhu 44 °C pada pH 10 ( $4,6 \times 10^7$  spora/ml) dan suhu 51 °C pada pH 7 ( $3,0 \times 10^7$  spora/ml). Kepadatan spora tertinggi berbanding lurus dengan kepadatan vegetatif yang didapat. Penelitian ini menunjukkan bahwa semakin tinggi suhu dan asamnya pH tidak menjadi indikator terhadap tingginya spora yang

dihasilkan. Studi menunjukkan bahwa spora yang ditumbuhkan pada suhu tinggi memiliki resistensi tinggi terhadap panas (Sneath, *et al.*, 1998; Monteiro, *et al.*, 2005). Peningkatan pH 6,0 – 8,1 di media sporulasi juga menyebabkan peningkatan resistensi spora terhadap panas (Hashimoto, *et al.*, 1969).

Berdasarkan hasil Two Way ANOVA dengan cara yang sama seperti Lampiran 6, diketahui bahwa masing-masing perlakuan suhu dan pH yang berbeda memberikan pengaruh terhadap produksi spora *B. megaterium* ( $p < 0,05$ ).

Selain itu, terdapat interaksi antara perlakuan suhu dan pH ( $p < 0,05$ ) yang menunjukkan bahwa perbedaan produksi spora dipengaruhi oleh kedua faktor perlakuan. Selanjutnya untuk mengetahui perbedaan antar kombinasi perlakuan yang diberikan, dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan uji Duncan. Hasil uji Duncan menunjukkan bahwa kombinasi perlakuan suhu dan pH memberikan produksi spora *B. megaterium* yang berbeda nyata. Hasil uji Duncan produksi spora *B. megaterium* disajikan pada Tabel 17, 18 dan 19.

**Tabel 17.** Kepadatan Spora di Bawah Suhu dan pH pada Waktu Inkubasi 18 Jam ( $\times 10^8$  sel/ml)

Suhu (°C)	pH			Rataan
	4	7	10	
37	0,09±0,01	0,48±0,03	1,08±0,13	0,55±0,50 <sup>b</sup>
44	0,05±0,01	0,05±0,01	0,11±0,01	0,07±0,04 <sup>a</sup>
51	0,08±0,01	0,10±0,00	0,04±0,00	0,07±0,03 <sup>a</sup>
<b>Rataan</b>	0,07±0,02 <sup>a</sup>	0,21±0,24 <sup>b</sup>	0,41±0,58 <sup>c</sup>	

Keterangan: Huruf yang berbeda pada kolom dan baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata ( $p < 0,05$ ).

**Tabel 18.** Kepadatan Spora di Bawah Suhu dan pH pada Waktu Inkubasi 60 Jam ( $\times 10^8$  sel/ml)

Suhu (°C)	pH			Rataan
	4	7	10	
37	0,17±0,01	4,27±0,06	5,53±0,15	3,32±2,81 <sup>b</sup>
44	0,11±0,01	0,17±0,02	0,26±0,01	0,18±0,08 <sup>a</sup>
51	0,12±0,01	0,20±0,01	0,07±0,00	0,13±0,07 <sup>a</sup>
<b>Rataan</b>	0,13±0,03 <sup>a</sup>	1,55±2,36 <sup>b</sup>	1,96±3,10 <sup>c</sup>	

Keterangan: Huruf yang berbeda pada kolom dan baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata ( $p < 0,05$ ).

**Tabel 19.** Kepadatan Spora di Bawah Suhu dan pH pada Waktu 108 Jam ( $\times 10^9$  sel/ml)

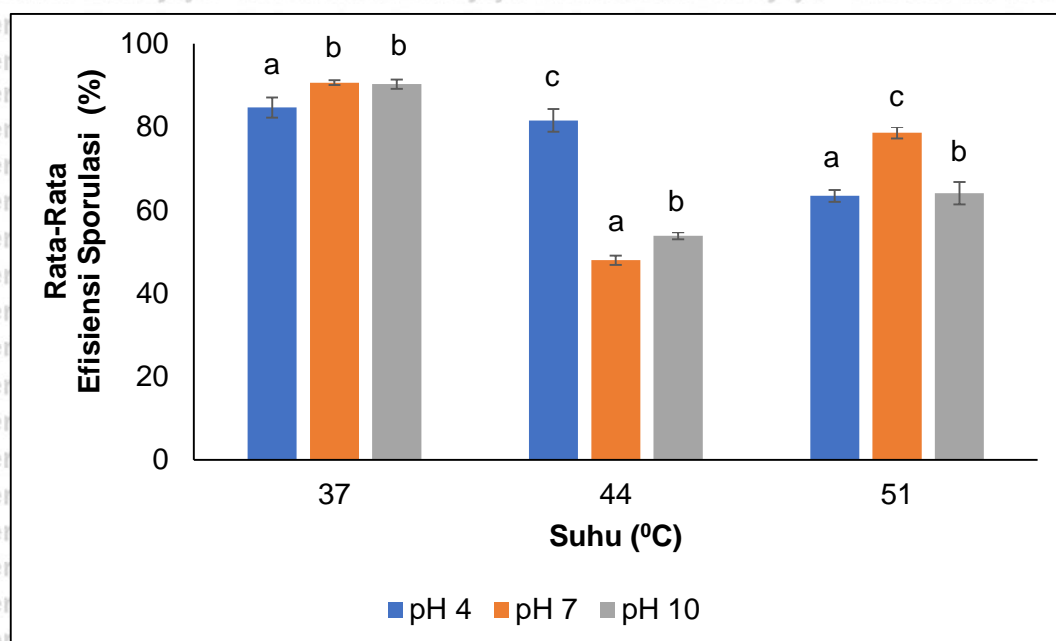
Suhu (°C)	pH			Rataan
	4	7	10	
37	0,02±0,00	0,47±0,00	1,00±0,01	0,50±0,49 <sup>c</sup>
44	0,01±0,00	0,02±0,00	0,05±0,00	0,03±0,02 <sup>b</sup>
51	0,02±0,00	0,03±0,00	0,01±0,00	0,02±0,01 <sup>a</sup>
<b>Rataan</b>	0,02±0,00 <sup>a</sup>	0,17±0,26 <sup>b</sup>	0,35±0,56 <sup>c</sup>	

Keterangan: Huruf yang berbeda pada kolom dan baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata ( $p < 0,05$ ).

Kepadatan spora *B. megaterium* pada waktu 18, 60 dan 108 jam menunjukkan nilai tertinggi pada perlakuan suhu 37 °C pada pH 10 jika dibandingkan dengan suhu 44 °C dan 51 °C. Berdasarkan penelitian Issahary, *et al.* (1974), penggunaan suhu inkubasi 44°C menurunkan kepadatan spora *Bacillus cereus* yang semula memiliki kepadatan  $10^8$  menjadi  $5 \times 10^5$ . Kondisi panas menentukan kelangsungan hidup dari spora *Bacillus*. Selain faktor media, faktor lingkungan merupakan faktor penting yang harus diperhatikan. Beberapa faktor lingkungan yang mempengaruhi pertumbuhan spora yaitu waktu inkubasi, suhu dan pH. Berdasarkan studi penelitian sebelumnya, perlakuan suhu tinggi yang diberikan dengan waktu inkubasi yang berbeda dapat mempengaruhi ketahanan panas dari spora (Sang-Wook dan Sim, 2006) serta kelangsungan hidup spora (Prentice dan Clegg, 1974). Perbedaan pH pada media kultur juga mempengaruhi proses sporulasi dan efisiensi sporulasi yang dihasilkan dengan waktu inkubasi yang berbeda (Monteiro, *et al.*, 2005).

### 5.2.3 Efisiensi Sporulasi

Setelah mendapatkan spora tertinggi dan vegetatif tertinggi, maka dilanjutkan dengan parameter efisiensi sporulasi untuk mengetahui persentase spora maksimal dengan vegetatif tertinggi sehingga dapat diketahui seberapa efisien persentase transisi yang didapat. Perbedaan rata-rata efisiensi sporulasi disajikan pada Gambar 21.



**Gambar 21.** Efisiensi Sporulasi *B. megaterium* di bawah Kondisi Suhu dan pH yang Berbeda

Nilai hasil efisiensi sporulasi tertinggi yaitu pada suhu 37 °C pH 7 (90,61%) kemudian diikuti dengan suhu 37 °C pH 10 (90,24%) dan keduanya menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan berdasarkan uji statistik. Fluktuasi suhu dan pH mempengaruhi hasil efisiensi sporulasi yang didapat, pH yang konstan pada media kultur akan mempertahankan efisiensi sporulasi yang didapat yaitu 50%, akan tetapi apabila terjadi penurunan pH pada media kultur, efisiensi sporulasi yang didapat hanya 6% (Monteiro, *et al.*, 2005). Sehingga kestabilan pH pada media kultur perlu diperhatikan untuk mempertahankan efisiensi sporulasi yang dihasilkan. Garcia-Marengoni, *et al.* (2015) menambahkan, salah satu upaya untuk mempertahankan dan meningkatkan efisiensi sporulasi agar mencapai nilai yang maksimal yaitu dengan penambahan garam mineral. Selain itu, dapat juga dilakukan melalui penambahan unsur besi nitrat pada media kultur sehingga dapat menjadi pemicu stres pada bakteri yang nantinya mengarah pada proses sporulasi yang lebih efisien. Kondisi ini dapat terjadi karena adanya proses penghambatan dari aktivasi histatasin fosfatase yang berperan dalam proses sporulasi.

Berdasarkan hasil Two Way ANOVA dengan cara yang sama seperti Lampiran 6, diketahui bahwa masing-masing perlakuan suhu dan pH yang berbeda memberikan pengaruh terhadap efisiensi sporulasi *B. megaterium* ( $p < 0,05$ ). Selain itu, terdapat interaksi antara perlakuan suhu dan pH ( $p < 0,05$ ) yang menunjukkan bahwa perbedaan efisiensi sporulasi dipengaruhi oleh kedua faktor perlakuan. Selanjutnya untuk mengetahui perbedaan antar kombinasi perlakuan yang diberikan, dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan uji Duncan. Hasil uji Duncan menunjukkan bahwa kombinasi perlakuan suhu dan pH memberikan efisiensi sporulasi *B. megaterium* yang berbeda nyata.

Sporulasi merupakan proses yang sangat kompleks yang terdiri dari beberapa tahapan sehingga untuk mendapatkan spora yang tinggi harus memperhatikan kondisi suhu dan pH pada media kultur (Monteiro, *et al.*, 2014). Menurut Boonstra, *et al.* (2013), tersedianya kepadatan sel yang tinggi ketika nutrisi dalam media mulai menurun akan memicu hasil efisiensi sporulasi yang tinggi. Hasil efisiensi sporulasi pada penelitian ini menunjukkan nilai yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan penelitian Pandey dan Wakil (2016), yang hanya mendapatkan efisiensi sporulasi sebesar 80% pada bakteri *B. coagulans* dengan suhu 37°C dan pH netral. Perbedaan hasil efisiensi sporulasi yang didapat karena spesies *Bacillus* yang berbeda dan media kultur yang berbeda.

#### 5.2.4 Laju Pertumbuhan dan Waktu Generasi Sel Vegetatif

Pertumbuhan maksimum bakteri memiliki waktu yang berbeda tergantung strain, habitat tumbuh, dan kesesuaian terhadap media tumbuh bakteri. Waktu generasi sangat berperan penting dalam kemampuan sel bakteri untuk membelah diri dalam satuan waktu. Pertumbuhan bakteri dan waktu generasi memiliki hubungan berbanding lurus. Semakin tinggi perbedaan pertumbuhan bakteri dari waktu ke waktu maka waktu generasi yang didapatkan akan semakin cepat.

Berdasarkan hasil Two Way ANOVA dengan cara yang sama seperti Lampiran 6 diketahui perbedaan perlakuan suhu dan perlakuan pH yang berbeda berpengaruh terhadap pertumbuhan *B. megaterium* ( $p < 0,05$ ). Selain itu terdapat interaksi antara perlakuan suhu dan perlakuan pH berbeda ( $p < 0,05$ ) menunjukkan bahwa hasil pertumbuhan dipengaruhi oleh kedua faktor perlakuan tersebut. Selanjutnya untuk mengetahui perbedaan antar kombinasi perlakuan yang diberikan, dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan uji Duncan. Hasil uji Duncan menunjukkan bahwa kombinasi perlakuan suhu dan pemberian pH berbeda memberikan hasil pertumbuhan yang berbeda nyata. Hasil uji Duncan pertumbuhan *B. megaterium* disajikan pada Tabel 20.

**Tabel 20.** Perbedaan Pertumbuhan dibawah Suhu dan pH yang Berbeda

Suhu	pH	Laju Pertumbuhan (/menit)	Waktu Generasi (menit)
37	4	26,40 <sup>a</sup>	93,13
	7	31,80 <sup>b</sup>	81,28
	10	39,00 <sup>c</sup>	63,01
44	4	24,00 <sup>a</sup>	94,02
	7	24,60 <sup>a</sup>	95,01
	10	27,60 <sup>b</sup>	90,51
51	4	21,00 <sup>a</sup>	97,41
	7	25,20 <sup>c</sup>	93,22
	10	23,40 <sup>b</sup>	96,15

Perbedaan *growth rate* pada setiap media tumbuh berbanding lurus dengan waktu generasi. Semakin tinggi pertumbuhan, maka semakin cepat waktu generasi sel yang terjadi. Pemberian perlakuan suhu yang semakin tinggi akan menurunkan pertumbuhan sel bakteri *B. megaterium*. Suhu 37°C dengan pH 10 memberikan *growth rate* tertinggi yaitu 39 per menit dengan waktu generasi 63,01 per menit. Media pertumbuhan dan spesies bakteri yang berbeda akan mempengaruhi pertumbuhan rata-rata bakteri (Powell dan Errington, 1962). Setiap spesies bakteri memiliki suhu optimal yang berbeda untuk pertumbuhan dan waktu generasi bakteri. *Bacillus cereus* memiliki suhu optimal untuk tumbuh yaitu 39,9°C,

*Listeria monocytogenes* suhu optimal untuk tumbuh yaitu 38,1°C, *Escherichia coli* suhu optimal untuk tumbuh yaitu 41,1°C, *Salmonella* suhu optimal untuk tumbuh yaitu 39,5°C. Suhu mampu mempengaruhi laju pertumbuhan bakteri dan jumlah total pertumbuhan bakteri. Suhu yang tidak sesuai dengan media hidup bakteri dapat mempengaruhi proses metabolisme sel dan dapat mengubah morfologi sel bakteri (Membre *et al.*, 2005).

pH dalam media pertumbuhan bakteri sangat berpengaruh dalam *growth rate* dan *generation time* sel bakteri. Bakteri *E. coli* mampu tumbuh maksimum pada pH 9. pH dapat mempengaruhi aktivitas enzim bakteri, aktivitas enzim akan maksimal pada saat kondisi pH optimum. Nilai pH sel bakteri dipengaruhi oleh pH media pertumbuhan. Jika media pertumbuhan bakteri tidak sesuai untuk aktivitas enzim maka bakteri tidak dapat melakukan metabolisme dengan baik dan mikroba tidak dapat tumbuh secara optimal (Jordan dan Jacobs, 1947).

### 5.2.5 Laju Pertumbuhan Maksimum Spora

Pertumbuhan spora *B. megaterium* mulai diamati pada saat sel vegetatif mampu memproduksi spora. Spora dapat terbentuk ketika sel vegetative berada pada lingkungan yang tidak mendukung seperti suhu dan pH ekstrim. Pengamatan mengenai laju pertumbuhan bertujuan untuk mengetahui pertumbuhan rata-rata spora tertinggi yang dipengaruhi oleh besaran transisi pada saat sel vegetative mampu memproduksi spora *B. megaterium*.

Berdasarkan hasil Two Way ANOVA dengan perhitungan seperti pada Lampiran 6 diketahui perbedaan perlakuan suhu dan perlakuan pH yang berbeda berpengaruh terhadap laju pertumbuhan spora *B. megaterium* ( $p < 0,05$ ). Selain itu terdapat interaksi antara perlakuan suhu dan perlakuan pH berbeda ( $p < 0,05$ ) menunjukkan bahwa hasil laju pertumbuhan spora dipengaruhi oleh kedua faktor perlakuan tersebut. Selanjutnya untuk mengetahui perbedaan antar kombinasi



perlakuan yang diberikan, dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan uji Duncan. Hasil uji Duncan menunjukkan bahwa kombinasi perlakuan suhu dan pemberian pH berbeda memberikan hasil laju pertumbuhan spora pada rentang waktu tertentu yang berbeda nyata. Hasil uji Duncan laju pertumbuhan spora *B. megaterium* disajikan pada Tabel 21.

**Tabel 21.** Laju Pertumbuhan Maksimum Spora *B. megaterium*

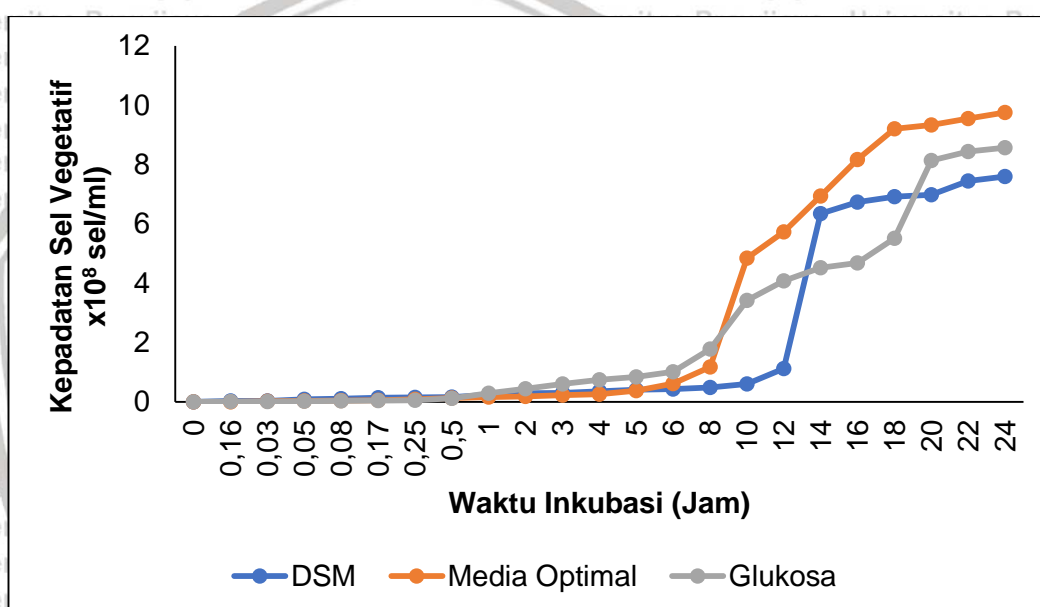
Suhu	pH	Laju Pertumbuhan Maksimum (/menit)
37	4	21,60±0,01 <sup>a</sup>
	7	22,80±0,02 <sup>b</sup>
	10	33,00±0,01 <sup>c</sup>
44	4	16,80±0,02 <sup>a</sup>
	7	18,00±0,01 <sup>b</sup>
	10	22,20±0,02 <sup>c</sup>
51	4	15,00±0,00 <sup>a</sup>
	7	19,80±0,02 <sup>c</sup>
	10	18,60±0,03 <sup>b</sup>

Perbedaan suhu dan perlakuan pH yang berbeda berpengaruh terhadap laju pertumbuhan spora *B. megaterium* yang dihasilkan. Suhu 37 °C dengan pH 10 memberikan nilai *growth rate* tertinggi jika dibandingkan dengan perlakuan lain yaitu 33 per menit. Setiap strain bakteri mempunyai kisaran suhu dan pH yang berbeda-beda untuk tumbuh. Kisaran suhu untuk pertumbuhan spora *Clostridium perfringens* dipengaruhi oleh media kultur. Pertumbuhan optimal terjadi pada media inkubasi 37-40°C (Walker dan Rohrbaugh, 1974). Spora *Bacillus cereus* lebih tahan terhadap kondisi pH ekstrim pada media hidupnya dibandingkan dengan sel vegetatif Spora *Bacillus cereus* mampu tumbuh pada pH 10 (Wong dan Chen, 1988). Media pertumbuhan bakteri seperti suhu, pH berperan penting terhadap aktivitas enzim yang digunakan untuk metabolisme sel bakteri vegetatif pada saat kondisi suhu dan pH ekstrim untuk membentuk spora bakteri *Bacillus stearothermophilus* (Long dan Williams, 1959).

### 5.3 Tahap 3

#### 5.3.1 Germinasi Spora *B. megaterium*

Hasil kepadatan sel vegetatif yang berasal dari germinasi spora menunjukkan fase pertumbuhan yang sama di seluruh perlakuan. Spora yang bergerminasi diawali dengan fase adaptasi pada media tumbuh yang baru (media NB) kemudian meningkat sampai pada fase eksponensial di akhir pengamatan germinasi. Perbandingan fase pertumbuhan kepadatan sel vegetatif antara media optimal dengan media komersil disajikan pada Gambar 22.



**Gambar 22.** Perbandingan Germinasi Spora pada Media Optimal dengan Media Komersil

Fase germinasi spora menjadi sel vegetatif yaitu melewati fase lag dan fase eksponensial hingga waktu 24 jam inkubasi. Kepadatan vegetatif tertinggi secara berurutan yaitu media optimal ( $9,8 \times 10^8$  sel/ml), glukosa ( $8,6 \times 10^8$  sel/ml) dan DSM ( $7,6 \times 10^8$  sel/ml). Hasil germinasi spora disebabkan karena kualitas spora pada media tumbuh berbeda-beda. Sebelum menjadi spora, vegetatif ditumbuhkan pada media optimal yang mempengaruhi sifat fisiologis dari vegetatif sebelum mengalami transisi menjadi spora. Hasil lebih rendah didapatkan pada penelitian Mansour, *et al.* (1999), dimana spora kembali bergerminasi antara 10

hingga 24 jam dan mencapai  $1,25 \times 10^8$  sel/mL. Kondisi ini dipengaruhi oleh perbedaan spesies *Bacillus* dan media yang digunakan saat perkecambahan.

Berdasarkan hasil One Way ANOVA dengan cara yang sama seperti Lampiran 6, diketahui bahwa masing-masing perlakuan media yang berbeda memberikan pengaruh terhadap germinasi *B. megaterium* ( $p < 0,05$ ). Selanjutnya untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan yang diberikan, dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan uji Duncan. Hasil uji Duncan menunjukkan bahwa perbedaan media memberikan kepadatan germinasi *B. megaterium* yang berbeda nyata (Tabel 22).

**Tabel 22.** Kepadatan Germinasi Spora pada Media Optimal dengan Komersil

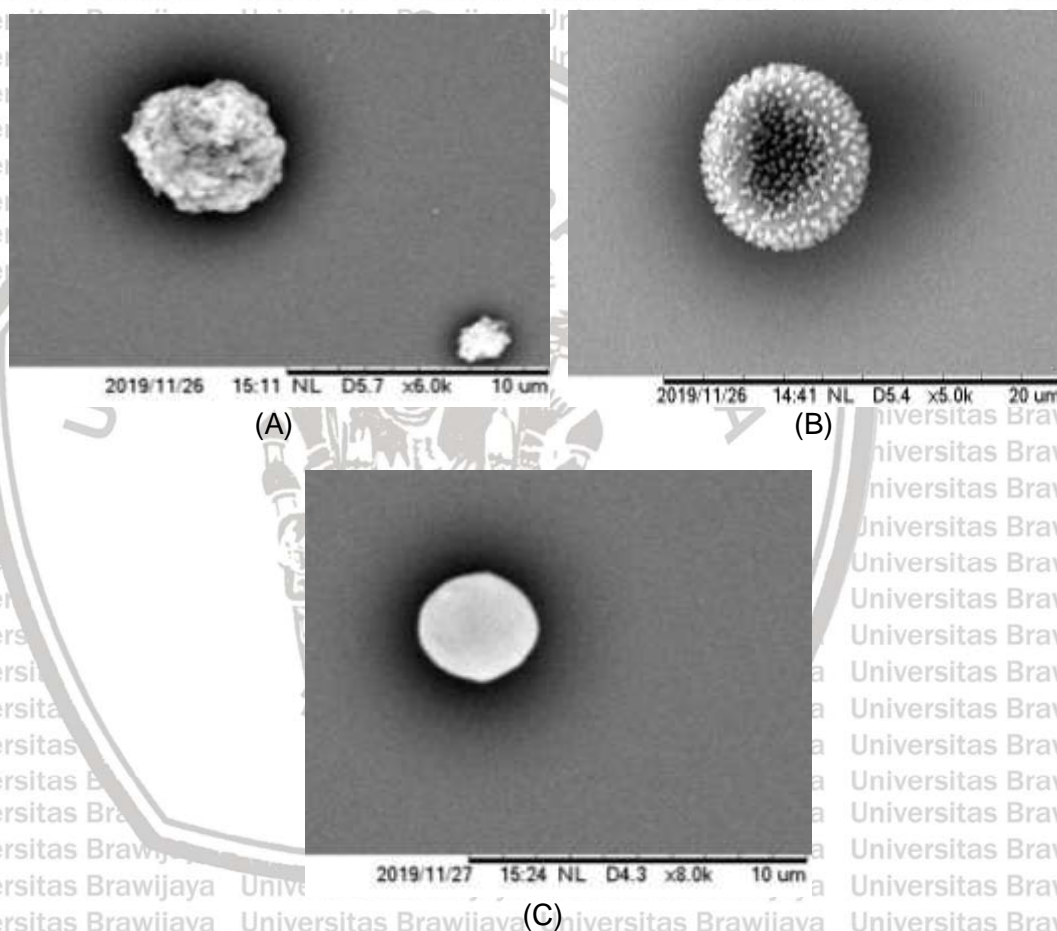
Waktu	Kepadatan Sel Vegetatif ( $\times 10^8$ sel/ml)		
	DSM	Media Optimal	Glukosa
4	0,36 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	0,27 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,75 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>
12	1,10 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	5,77 $\pm$ 0,15 <sup>c</sup>	4,13 $\pm$ 0,15 <sup>b</sup>
24	7,60 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	9,80 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>	8,60 $\pm$ 0,20 <sup>b</sup>

Keterangan: Huruf yang berbeda pada kolom dan baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata ( $p < 0,05$ ).

Perbedaan kepadatan vegetatif dari spora yang bergerminasi pada media kultur disebabkan karena beberapa faktor yaitu kepadatan spora yang ditambahkan, suhu inkubasi, aktivasi panas dan oksigen (Aislabile dan Deslippe, 2013; Sarudu, *et al.*, 2015). Penelitian lain menunjukkan bahwa aktivasi panas tidak dapat dijadikan indikator untuk mendapat spora yang bergerminasi tinggi karena hasil menunjukkan bahwa spora yang tidak diaktivasi dengan panas mencapai 94% spora yang bergerminasi jika dibandingkan dengan spora yang dipanaskan (Mingmongkolchai dan Panbangred, 2018). Aktivasi spora akan mempengaruhi reseptor dari spora yang bergemini pada *Bacillus subtilis* (Al-hinai, *et al.*, 2015). Cheung *et al.* (1982), menambahkan, tingkat perkecambahan *B. steurothermophilus* mengalami peningkatan pada kondisi lingkungan yang ekstrim salah satunya yaitu kekurangan nutrisi.

### 5.3.2 Morfologi dan Ukuran Spora Melalui SEM

Perbedaan morfologi dan ukuran spora *B. megaterium* yang ditumbuhkan pada media optimal dan dibandingkan dengan media komersil menunjukkan kisaran diameter spora yang berbeda-beda (Gambar 23). Spora *B. megaterium* pada media optimal ditumbuhkan di tepung terigu dengan dosis karbon 5 g/L pada suhu 37°C, pH 10 yang dibandingkan dengan media komersil (glukosa) dan DSM (*difco sporulation medium*).



**Gambar 23.** Perbedaan Morfologi Spora pada Berbagai Media; A) DSM (6000x); B) Media Optimal (5000x); C) Glukosa (8000x)

Bentuk spora yang membedakan dengan sel vegetatif yaitu spora berbentuk bulat sedangkan vegetatif batang (Yuniarti, *et al.*, 2019). Pengukuran diameter spora melalui aplikasi yang terhubung ke komputer dari SEM didapatkan hasil diameter spora pada tepung terigu yaitu 1,35-1,39  $\mu\text{m}$ , glukosa 3,39-3,58  $\mu\text{m}$

dan DSM 2,07-2,19  $\mu\text{m}$ . Perbedaan diameter spora *B. megaterium* disebabkan karena adanya perbedaan komposisi nutrisi yang terdapat di media tumbuh spora.

Secara visualisasi SEM dapat diketahui bahwa pada media tepung terigu sebagai media optimal, struktur spora masih tersusun dengan seresah tepung yang menyelimuti bagian dalam spora. Pada media glukosa spora tampak jernih dan berwarna putih jelas sedangkan pada media DSM spora struktur spora lebih jelas jika dibandingkan dengan media optimal. Perbedaan komposisi media akan berpengaruh terhadap hasil SEM spora yang didapat. Selain struktur spora, perbedaan media tumbuh juga mempengaruhi ukuran spora yang dihasilkan. Pada penelitian ini menunjukkan diameter spora tertinggi didapatkan pada media glukosa yaitu dengan diameter 3,39-3,58  $\mu\text{m}$ . Akan tetapi, belum ada ukuran standar spora yang nantinya berpengaruh atau tidak terhadap kualitas spora *Bacillus* baik secara pengujian *in vitro* maupun *in vivo*. Ukuran spora *B. subtilis* yang dihasilkan pada penelitian Carrera, *et al.* (2006) yaitu *B. antrachis* memiliki ukuran 0,81-0,86 mikron. Penelitian Chada, *et al.* (2003) menemukan ukuran spora *B. subtilis* yaitu 1,2 – 1,8  $\mu\text{m}$ .

## 6. KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari hasil penelitian tesis ini yaitu sebagai berikut :

- Media terigu merupakan media terbaik dalam memproduksi spora *B. megaterium* dengan dosis karbon yang digunakan yaitu 15 g/l. Kepadatan spora *B. megaterium* yang didapatkan yaitu  $1,5 \times 10^9$  spora/ml dengan durasi terbentuknya spora yaitu 12 jam.
- Suhu  $37^\circ\text{C}$  dan pH 10 merupakan media optimal untuk produksi spora *B. megaterium* pada media tepung terigu dan dosis karbon 15 g/l. Kepadatan spora yang dihasilkan yaitu  $1,0 \times 10^9$  spora/ml dengan durasi terbentuknya spora yaitu 12 jam.
- Kisaran ukuran spora *B. megaterium* yang dihasilkan pada media tumbuh optimal yaitu 1,35-1,39  $\mu\text{m}$ .

### 6.2 Saran

Saran dari penelitian tesis ini yaitu untuk mendapatkan pertumbuhan sel vegetatif *B. megaterium* yang ditumbuhkan pada media tepung terigu dosis karbon 15 gram/liter dapat dilakukan pada suhu  $37^\circ\text{C}$  dan produksi spora pada suhu  $51^\circ\text{C}$  dan pH 10.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adams, T. T., Eiteman, M. A. and Hanel, B. M. 2002. Solid state fermentation of broiler litter for production of biocontrol agents. *Bioresource Technology*. **82** (1): 33–41.
- Afrilasari, W., Widanarni., Meryandini, A. 2016. Effect of probiotic *Bacillus megaterium* PB 1.4 on the population of intestinal microflora, digestive enzyme activity and the growth of Catfish (*Clarias* sp.) *Hayati Journal of Bioscience*. **23**: 168-172.
- Agwa, O. K. and Ossai-Chidi, L. N. 2016. Surveillance of the microbial quality of soybean products sold within markets in port harcourt metropolis, rivers state, Nigeria. *Food and Public Health*. **6** (5): 130-139.
- Aislabie J. and Deslippe, J. R. 2013. Soil Microbes and Their Contribution to Soil Services (In: Dymond JR (ed) Ecosystem Services in New Zealand-Conditions and Trends. Manaaki Whenua Press, Lincoln) pp 143-161.
- Alden, L., Demoling, F. and Baath, E. 2001. Rapid method of determining factors limiting bacteria growth in soil. *Environmental Microbiology*. **67** (4): 1830-1838.
- Al-hinai, M. A., Jones, S. W. and Papoutsakis, E. T. 2015. The Clostridium sporulation programs: diversity and preservation of endospore differentiation. *Microbiology Molecularr Biological Revision*. **79** (1): 19-37.
- Amaha, M. and Ordal, Z. J. 1957. Effect of divalent cations in the sporulation medium on the thermal death rate of *Bacillus coagulans* var. *Thermoacidurans*. *Journal of Bacteriology*. **74** (5): 596-604.
- Amin, G., Alotaibi, S., Narmen, Y. A. and Saleh, W. D. 2008. Bioinsecticide production by the bacterium *Bacillus thuringiensis*. 1. Pattern of cell growth, toxin production and by-product synthesis. *Archives of Agronomy and Soil Science*. **54** (4): 387–394.
- Ananthanarayanan, L. and Dubhashi, A. 2016. Study of probiotic attributes of two isolates *Bacillus aerius* and *Bacillus cereus*. *International Journal of Research Studies in Biosciences*. **4** (4): 34–39.
- Andalib, R., Majid, M. Z. A., Hussin, M. W., Ponraj, M., Keyvanfar, A., Mirza, J. and Lee, H. S. 2016. Optimum concentration of *Bacillus megaterium* for strengthening structural concrete. *Construction and Building Materials*. **118**: 180-193.
- Andrew, D. R., Fitak, R. R., Munguia-Vega, A., Racolta, A., Martinson, V. G. and Dontsova, K. 2012. Abiotic factors shape microbial diversity in sonoran desert soils. *Applied and Environmental Microbiology*. **78** (2): 7527-7537.
- Andriani, Y., Rochima, E., Safitri, R. and Rahayuningsih, S. R. 2017. Characterization of *Bacillus megaterium* and *Bacillus mycoides* bacteria as probiotic bacteria in fish and shrimp feed. *KnE Life Science*. 127-135.

- Annibaldi, F., Fenicia, L., Franciosa, G. and Aureli, P. 2002. Influence of pH and temperature on the growth of and toxin production by neurotoxicogenic strains of *Clostridium butyricum* type E. *Journal of Food Protection*. **65** (8): 1267-1270.
- Aronson, A. I. and Fitz-James, P. 1976. Structure and morphogenesis of bacterial spore coat. *Bacteriology Revision*. **40** (2): 360-402.
- Atrih, A and Foster, S. J. 1999. The role of peptidoglycan structure and structural dynamic during endospore dormancy and germination. *Antonie van Leeuwenhoek*. **75** (4): 299-307.
- Awad, H. M., Malek, R. A., Othman, N. Z., Elmarzughi, N., Leng, O. M., Ramli, S., Aziz, R., El-Enshasy, H. A. 2015. Bioprocess development for enhanced spore production in shake flask and pilot scale bioreactors of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in submerged culture. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. **10** (1): 103-108.
- Azizah, S. N., Mubarik, N. R. and Sudirman, L. I. 2015. Potential of chitinolytic *Bacillus amyloliquefaciens* SAHA 12.07 and *Serratia marcescens* KAHN 15.12 as biocontrol agents of *Ganoderma boninense*. **10** (10): 452-465.
- Barbosa, T. M., Serra, C. R., La Ragione, R. M., Woodward, M. J. and Henriques, A. O. 2005. Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract. *Applied Environmental Microbiology*. **71**: 968-978.
- Baril, E., Corolle, L., Couvert, O., EL Jabri, M., Leguerinel, I., Postollec, F., Boulais, C., Carlin, F., Mafart, P. 2012. Sporulation boundaries and spore formation kinetics of *Bacillus* spp. as a function of temperature, pH and  $a_w$ . *Food Microbiology*. **32**: 79-86.
- Basu, S. Bose, C. Ojha, N. Das, N. Das, J., Pal, M. and Khurana, S. 2015. Evolution of bacterial and fungal growth media. *Bioinformation*. **11**(4): 182–184.
- Bayane, A., Diawara, B., Dubois, R. D., Destain, J., Roblain, D. and Thonart, P. 2010. Isolation and characterization of new spore-forming lactic acid bacteria with prospects of use in food fermentations and probiotic preparations. *African Journal of Microbiology Research*. **4** (11): 1016-1025.
- Beaman, T. C., Pankratz, H.S. and Gerhardt, P. 1971. Paracrystalline sheets reaggregated from solubilized exosporium of *Bacillus cereus*. *Journal Bacteriology*. **107** (1): 320-324.
- Beilen, J. W. A. and Brul, S. 2013. Compartment-specific pH monitoring in *Bacillus subtilis* using fluorescent sensor proteins: a tool to analyse the antibacterial effect of weak organic acid. *Frontiers in Microbiology*. **4** (157): 1-11.
- Berendsen, E. M., Koning, R. A., Boekshort, J., Jong, A. D., Kuipers, O. P. and Wells-Bennik, M. H. J. 2016. High-level heat resistance of spore of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus licheniformis* results from the presence of a *spoVA* operon in a Tn1546 transposon. *Frontiers in Microbiology*. **7**: 1-10.
- Berikashvili, V., Sokhadze, K., Kachlishvili, E., Elisashvili, V. and Chikindas, M. L. 2017. *Bacillus amyloliquefaciens* spore production under solid-state fermentation of lignocellulosic residues. *Probiotics and Antimicrobial*



*Proteins*. **10**: 755–761.

Bernardeau, M., Lehtinen, M. J., Forssten, S. D. and Nurminen, P. 2017. Importance of the gastrointestinal life cycle of *Bacillus* for probiotic functionality. *Journal of Food Science and Technology*. **54** (8): 2570–2584.

Bertrand, R. L. 2019. Lag phase is a dynamic, organized, adaptive and evolvable period that prepares bacteria for cell division. *Journal of Bacteriology*. **201** (7): 1-21.

Boddy, L. and Wimpenny, J. W. T. 1992. Ecological concepts in food microbiology. *Journal Applied Bacteriology*. **73**: 23-38.

Boonstra, M., de Jong, I. G., Scholefield, G., Murray, H., Kuipers, O. P. and Veening, J. W. 2013. Spo0A regulates chromosome copy number during sporulation by directly binding to the origin of replication in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*. **87**: 925-938.

Borah, B., Thakur, P. S. and Nigam, J. N. 2002. The influence of nutritional and environmental conditions on the accumulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in *Bacillus mycoides* RLJ B-017. *Journal of Applied Microbiology*. **92**: 776-783.

Bressuire-Isoard, C., Broussolle, V. and Carlin, F. 2018. Sporulation environment influences spore properties in *Bacillus*: evidence and insights on underlying molecular and physiological mechanisms. *FEMS Microbiology Reviews*. **42** (5): 614-626.

Broder, D. H. and Pogliano, K. 2006. Forespore engulfment mediated by a ratchet-like mechanism. *Cell*. **126** (5): 917-928.

Buhr, T. L., Mcpherson, D. C. and Gutting, B. W. 2008. Analysis of broth-cultured *Bacillus atrophaeus* and *Bacillus cereus* spores. *Journal of Applied Microbiology*. **105**: 1604-1613.

Buruiana, C. T., Profir, A. G. and Vizireanu, C. 2014. Effects of probiotic bacillus species in aquaculture – An overview. *Annals of the University Dunarea de Jos of Galati, Fascicle VI: Food Technology*. **38** (2): 9–17.

Carrera, M., Zandomeni, R. O. and J. L. Sagripanti. 2008. Wet and dry density of *Bacillus anthracis* and other *Bacillus* species. *Journal of Applied Microbiology*. **105**: 68-77.

Carrera, M., Zandomeni, R. O., Fitzgibbon, J. and Sagripanti, J. L. 2007. Difference between the spore sizes of *Bacillus anthracis* and other *Bacillus* species. *Journal of Applied Microbiology*. **102**: 303-312.

Casula, G. and Cutting, S. M. 2002. *Bacillus* probiotics: Spore germination in the gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*. **68** (5): 2344–2352.

Cebrian, G., Condon, S. and Manas, P. 2017. Physiology of the Inactivation of vegetative bacteria by thermal treatments: mode of action, influence of environmental factors and inactivation kinetics. *Foods*. **6** (12): 1-21.

Ceuppens, S., Uyttendaele, M., Hamelink, S., Boon, N. and Van De Wiele, T. 2012. Inactivation of *Bacillus cereus* vegetative cells by gastric acid and bile during

in vitro gastrointestinal transit. *Gut Pathogens*. **4** (1): 5–11.

Ceuppens, S., Van de Wiele, T., Rajkovic, A., Ferrer-Cabaceran, T., Heyndrickx, M., Boon, N. and Uyttendaele, M. 2012. Impact of intestinal microbiota and gastrointestinal conditions on the in vitro survival and growth of *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*. **155** (3): 241–246.

Ceuvas, L. A., Egge, J. K., Thingstad, T. F. and Topper, B. 2011. Organic carbon and mineral nutrient limitation of oxygen consumption, bacterial growth and efficiency in the Norwegian Sea. *Polar Biology*. **34**: 871–882.

Chada, V. G. R., Sanstad, E. A., Wang, R. and Driks, A. 2003. Morphogenesis of *Bacillus* spore surfaces. *Journal Bacteriology*. **185** (21): 6255–6261.

Cheba, B. A., Zaghloul, T. B., El-Mahdy, A. R. and El-Massry, M. H. 2017. Effect of carbon sources on *Bacillus* sp. R2 chitinase production. *Advances in Environmental Biology*. **11** (3): 75–80.

Checinska, A., Paszczynski, A. and Burbank, M. 2015. *Bacillus* and other spore forming genera: variations in responses and mechanisms for survival. *Annual Review Food Science Technology*. **6**: 351–369.

Chen, Z. M., Li, Q., Liu, H. M., Yu, N., Xie, T. J., Yang, M. Y and Chen, X. D. 2010. Greater enhancement of *Bacillus subtilis* spore yields in submerged cultures by optimization of medium composition through statistical experimental designs. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **85** (5): 1353–1360.

Cheung, H., Brown, M. R. W. and Vitkovic, L. 1982. Dependence of *Bacillus stearothermophilus* spore germination depletion and manganese. *Journal of general microbiology*. **128** (10): 2403–2409.

Cho, J., Kim, E. and Kim, Y. 2009. Optimization of culture media for *Bacillus* species by statistical experiment design method. *Korean Journal of Chemical Engineering*. **26** (3): 754–759.

Choe, H. M., M. Kim and E. K. Lee. 2017. EMSaov: an r package for the analysis of variance with the expected mean squares and its shiny application. *The R Journal*. **9** (1): 252–261.

Clavel, T., Carlin, F., Lairon, D., Nguyen-The, C. and Schmitt, P. 2004. Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach. *Journal of Applied Microbiology*. **97** (1): 214–219.

Collect, B. M. 1970. Scanning electron microscopy: a review and report of research in wood science. *Wood and Fiber*. **2** (2): 113–133.

Condon, S., Bayaris, M. and Sals, F. J. 1992. Influence of the sporulation temperature upon the heat resistance of *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology*. **73** (3): 251–256.

Cook, A. M. and Gilbert, R. J. 1968. Factors affecting the heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores II. The effect of sporulating conditions and nature of the heating medium. *Journal of Food Technology*. **3** (3): 295–302.

Coolidge, L. F. 2013. *Statistics: A Gentle Introduction*, Third Edition. United States of America. SAGE Publications. 488 pp.



Corcoran, B. M., Stanton, C., Fitzgerald, G. F. and Ross, R. P. 2005. Survival of probiotic *Lactobacilli* in acidic environments is enhanced in the presence of metabolization sugars. *Applied and Environmental Microbiology*. **71** (6): 3060–3067.

Cotter, P. D. and Hill, C. 2003. Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **67** (3): 429–453.

Cruz, P. M., Ibanez, A. L., Hesmosillo, O. A. M. and Saad, H. C. R. 2012. Use of probiotics in aquaculture. *International Scholarly Research Network Microbiology*. 1-13.

Cutting, S. M. 2011. *Bacillus* probiotics. *Food Microbiology*. **28** (2): 214–220.

Cutting, S. M., Hong, H. A., Baccigalupi, L. and Ricca, E. 2009. Oral vaccine delivery by recombinant spore probiotics. *International Reviews of Immunology*. **28** (6): 487–505.

Davis, M. L. and Cornwell, D. A. 2012. Introduction to environmental engineering, fifth ed. USA. McGraw-Hill Education. 1056 pp.

Dawes, I. W. and Thornley, J. H. M. 1970. Sporulation in *Bacillus subtilis* theoretical and experimental studies in continuous culture systems. *Journal of General Microbiology*. **62**: 49-66.

Dawes, I. W. and Mandelstam, J. 1970. Sporulation of *Bacillus subtilis* in continuous culture. *Journal of Bacteriology*. **103** (3): 529-535.

Demoling, F., Figueroa, D. and Baath, E. 2007. Comparison of factors limiting bacterial growth in different soils. *Soil Biology and Biochemistry*. **39** (10): 2485–2495.

Desai, S. V. and Varadaraj, M. C. 2010. Behavioural pattern of vegetative cells and spores of *Bacillus cereus* as affected by time-temperature combinations used in processing of Indian traditional food. *Journal food Science and Technology*. **47** (5): 549-556.

De Vos, P., G. M. Garrity., D. Jones., N. R. Krieg., W. Ludwig., F. A. Rainey., K. Schleifer and W. B. Whitman. 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second Edition Volume Three, The Firmicutes*. University of Georgia. Springer. 1399 pp.

De Vries, Y. P., Atmaja, R. D., Hornstra, L. M., de Vos, W. M. and Abee, T. 2005. Influence of glutamate on growth, sporulation, and spore properties of *Bacillus cereus* ATCC 14579 in Defined Medium. *Applied and Environmental Microbiology*. **71** (6): 3248–3254.

Dhingra, H. and Chaudhary, K. 2009. Evaluation of the growth pattern of *Bacillus thuringiensis* BtIII in different media containing low-cost agro-industrial based carbon sources. *Acta Agriculturae Serbica*. **14** (28): 49–55.

Diaz-Garcia, A., Garcia-Riano, J. and Zapata-Narvaez, J. 2015. Improvement of sporulation conditions of a new strain of *Bacillus amyloliquefaciens* in liquid fermentation. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. **6**: 302-310.

- Dinarvand, M., Rezaee, M., Masomian, M., Jazayeri, S. D., Zereian, M., Abbasi, S. and Ariff, A. B. 2013. Effect of C/N ratio and media optimization through response surface methodology on simultaneous productions of intra and extracellular inulinase and invertase from *Aspergillus niger* ATCC 20611. *BioMed Research International*. 1-13.
- Domanska, M., Hamal, K., Jasionowski, B. and Lomotowski, J. 2019. Bacteriological contamination detection in water and wastewater samples using OD600. *Polish Journal of Environmental Studies*. **28** (6): 4503-4509.
- Driks, A. 1999. *Bacillus subtilis* spore coat. *Microbiology Molecular Biology Reviews*. **63** (1): 1-20.
- Eklblad, A. L. F. and Nordgren, A. 2002. Is growth of soil microorganism in boreal forests limited by carbon or nitrogen availability?. *Plant and Soil*. **242**: 115-122.
- El-Bendary, M. A. 2006. *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* biopesticides production. *Journal of Basic Microbiology*. **46** (2): 158–170.
- Eppinger, M., B. Bunk., M. A. Johns., J. N. Edirisinghe., K. K. Kutumbaka., S. S. K. Koenig., H. H. Creasy., M. J. Rosovitz., D. R. Riley., S. Daugherty., M. Martin., L. D. H. Elbourne., I. Paulsen., R. biedendieck., C. Braun., S. Grayburn., S. Dhingra., V. Lukyanchuk., B. Ball., R. Ul-Qamar., J. Seibel., E. Bremer., D. Jahn., J. Ravel and P. S. Vary. 2011. Genome sequences of the biotechnologically important *Bacillus megaterium* strains QM B1551 and DSM319. *Journal of Bacteriology*. **193** (16): 4199-4213.
- Erem, F., Inan, M. and Certel, M. 2018. Optimisation of *Bacillus amyloliquefaciens* FE-K1 extracellular peptidase production by response surface methodology. *Trakya University Journal of Natural Sciences*. **19** (2): 159-173.
- Ernandes, S., Bianchi, V. L. D. and Moraes, I. O. 2013. Evaluation of two different culture media for the development biopesticides based on *Bacillus thuringiensis* and their application in larvae of *Aedes aegypti*. *Acta Scientiarum, Technology*. **35** (1): 11-18.
- Errington, J. 2003. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews Microbiology*. **1** (2): 117-126.
- Eschlbeck, E., Bauer, S. A. W. and Kulozik, U. 2017. Effect of cultivation pH on the surface hydrophobicity of *Bacillus subtilis* spore. *AMB Express*. **7** (157): 1-7.
- Escobar, I. C. Randall, A. A. and Taylor, J. S. 2001. Bacterial growth in distribution systems: Effect of assimilable organic carbon and biodegradable dissolved organic carbon. *Environmental Science and Technology*. **35**(17): 3442–3447.
- Farid, A. F. and Larsen, J. L. 1981. Growth of *Vibrio alginolyticus*: interacting effects on pH, temperature, salt concentration, and incubation time. *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene: I. Abt. Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie*. **2** (1): 68–75.
- Fernandez-Coll, F. and Rodriguez-Toro, W. 1986. Thermal resistance of spores of two species of the genus *Bacillus*. *Journal Agriculture Univ*. **70**: 189-195.

- Fichtel, J., Koster, J., Rullkotter, J. and Sass, H. 2008. Spore dipicolinic acid contents used for estimating the number of endospores in sediments. *FEMS Microbiology Ecology*. **61**: 522-532.
- Freedman, A. J. E. Peet, K. C. Boock, J. T. Penn, K. Prather, K. L. J. and Thompson, J. R. 2018. Isolation, development, and genomic analysis of *Bacillus megaterium* SR7 for growth and metabolite production under supercritical carbon dioxide. *Frontiers in Microbiology* **9**: 1–21.
- Fonte, E. S., Amado, A. M., Meireles-Pereira, F., Esteves, F. A., Rosado, A. S. and Farjalla, V. 2013. The combination of different carbon source enhance bacterial growth efficiency in aquatic ecosystems. *Environmental Microbiology*. 1-9.
- Forget, N., Belzile, C., Rioux, P. and Nozais, C. 2010. Teaching the microbial growth curve concept using microalgal cultures and flow cytometry. *Journal of Biological Education*. **44** (4): 185-189.
- Gabriel, U. U., Akinrotimi, O. A., Bekibele, D. O., Onunkwo, D. N., Anyanwu, P. E. and Harcourt, P. 2007. Locally produced fish feed : potentials for aquaculture development in subsaharan Africa. *African Journal of Agricultural Research*, **2** (7): 287–295.
- Gao, L. and Liu, X. Z. 2009. A novel two stage cultivation method to optimize carbon concentration and carbon to nitrogen ratio for sporulation of biocontrol fungi. *Folia Microbiologica*. **54** (2): 142-146.
- Garcia-Marengoni, N., De Moura, M. C., Tavares, N., De Oliveira, E., Bombardelli, R. A. and Menezes-Albuquerque, D. 2015. Use of probiotics *Bacillus cereus* var. *toyoi* and *Bacillus subtilis* C-3102 in the diet of juvenile Nile tilapia cultured in cages. *Latin American Journal of Aquatic Research*. **43** (3): 601–606.
- Garland, C. D., Lee, A. and Dickson, M. R. 1979. The preservation of surface-associated micro-organism prepared for scanning electron microscopy. *Journal Microscopy*. **116** (2): 227-242.
- Garti-Levi, S., Eswara, A., Smith, Y., Fujita, M. and Ben-Yehuda, S. 2013. Novel modulators controlling entry into sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*. **195** (7): 1475-1483.
- Gauvry, E., Mathot, A., Couvert, O., Leguerinel, I., Jules, M. and Coroller, L. 2019. Differentiation of vegetative cells into spores: a kinetic model applied to *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*. **85** (10): 1-13.
- Ghosh, J., Larsson, P., Singh, B., Pettersson, B. F. M., Islam, N. M., Sarkar, S. N., Dasgupta, S. and Kirsebom, L. A. 2009. Sporulation in mycobacteria. *PNAS*. **106** (26): 10781-10786.
- Ghosh, K. and Ray, A. K. 2017. Aquafeed Formulation Using Plant Feedstuffs: Prospective Application Of Fish-Gut Microorganisms and Microbial Biotechnology Chapter 5. *Soft Chemistry and Food Fermentation*, Elsevier. 143 pp.

- Gibson, B., Wilson, D. J., Feil, E. and Eyre-Walker, A. 2018. The distribution of bacterial doubling times in the wild. *Proceedings Biological Science*. **285**: 1-9.
- Gomes, D. E. and Reis, E. M. 2013. Influence of substrates, light, filter paper and pH on the sporulation of *Cercospora sojina*. *Summa Phytopathology*. **39** (2): 126-129.
- Gopinathan, C., Chaudhury, A. and Vivek, A. T. 2016. Novel techniques for cost-effective production of *Bacillus thuringiensis* Subsp. *israelensis*. *International Journal of Mosquito Research*. **3** (4): 17-29.
- Goswami, G., Panda, D., Samanta, R., Boro, R. C., Modi, M. K., Bujarbaruah, K. M. and Barooah, M. 2018. *Bacillus megaterium* adapts to acid stress condition through a network of genes: Insight from a genome-wide transcriptome analysis. *Scientific Reports*. **8**: 1-12.
- Gouda, M. K., Swellam, A. E and Omar, S. H. 2001. Production of PHB by *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. *Microbiological Research*. **156** (3): 201-207.
- Gougoulias, C., Clark, J. M. and Shaw, L. Z. 2013. The role of soil microbes in the global carbon cycle: tracking the below-ground microbial processing of plant-derived carbon for manipulating carbon dynamics in agricultural systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1-11.
- Gray, D. A., Dugar, G., Gamba, P., Strahl, H., Jonker, M. J. and Hamoen, L. W. 2019. Extreme slow growth as alternative strategy to survive deep starvation in bacteria. *Nature communications*. **10** (1): 1-12.
- Gusewell, S. and Gessner, M. O. 2009. N:P ratios influence litter decomposition and colonization by fungi and bacteria in microcosms. *Functional Ecology*. **23**: 211-219.
- Hageman, J. H., Shankweiler, G. W., Wall, P. R., Franich, K., Mccowan, G. W., Cauble, S. M., Grajeda, J. and Quinones, C. 1984. Single, chemically defined sporulation medium for *Bacillus subtilis*: growth, sporulation and extracellular protease production. *Journal of Bacteriology*. **160** (1): 438-441.
- Hagen, S. J. 2010. Exponential growth of bacteria: constant multiplication through division. *American Journal of Physics*. **78** (12): 1290-1296.
- Hai, N. V. 2015. The use of probiotics in aquaculture. *Journal of Applied Microbiology*. **119** (4): 917-935.
- Hall, B. G., Acar, H., Nandipati, A. and Barlow, M. 2013. Growth rates made easy. *Molecular Biology and Evolution*. **13** (1): 232-238.
- Hardy, S. P. 2002. Human Microbiology. New Fetter Lane, London. Taylor and Francis. p 46.
- Hashimoto, T., Frieben, W. R. and Conti, S. F. 1969. Germination of single bacteria spores. *Journal Bacteriology*. **98** (3): 1011-1120.
- Hassan, S. S. Bt Abd Malek, R. Atim, A. Jikan, S. S. and Mohd Fuzi, S. F. Z. 2014. Effects of Different Carbon Sources for High Level Lactic Acid Production by

*Lactobacillus casei*. *Applied Mechanics and Materials*. **695**: 220–223.

Henriques AO and Moran CP., Jr. 2007. Structure, assembly, and function of the spore surface layers. *Annu Rev Microbiol*. **61**: 555–588.

Hong, H. A., Le, H. D. and Cutting, S. M. 2005. The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiology Reviews*. **29** (4): 813–835.

Hu, Y., Zhao, N., Gan, T., Duan, J., Yu, H. J., Meng, D., Liu, J. and Weng., L. 2017. Analytic method on characteristic parameters of bacteria in water by multiwavelength transmission spectroscopy. *Journal of Spectroscopy*. 1-7.

Hura, M. U. D., Zafar, T., Borana, K., Prasad, J. R. and Iqbal, J. 2018. Effect of commercial probiotic bacillus megaterium on water quality in composite culture of major carps. *International Journal of Current Agricultural Sciences*. **8** (1A): 268–273.

Inkson, B. J. 2016. Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) for materials characterization. *Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods*. 17-43.

Iqbal, S. A. and A. Rehman. 2015. Characterization of lipase from *Bacillus subtilis* I-4 and its potential use in oil contaminated wastewater. *Brazilian Arch. Biol. Technol*. **58** (5): 789–797.

Irma, A., Meryandini, A. and Rupaedah, B. 2018. Biofungicide producing bacteria: an in vitro inhibitor of *Ganoderma boninense*. *Journal of Biosciences*. **25** (4): 151-159.

Isnawati and Trimulyono, G. 2018. Temperature range and degree of acidity growth of isolate of indigenous bacteria on fermented feed “fermege”. *Journal of Physics: Conference Series*. **953** (1): 1-5.

Issahary, G., I. Hertman and Z. Evenchik. 1974. Temperature sensitivity of sporulation in *Bacillus cereus*. *Journal of General Microbiology*. **85**:368-371.

Jamal, M. T., I. A. Abdulrahman., M. Al Harbi and S. Chithambaran. 2019. Probiotics as alternative control measures in shrimp aquaculture: a review. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*. **7** (3): 69-77.

Jenkinson, H. F., Sawyer, W. D. and Mandelstam, J. 1981. Synthesis and order of assembly of spore coat proteins in *Bacillus subtilis*. *Journal of General Microbiology*. **123**: 1-16.

Jinks, D. C., Guthrie, R. and Naylor, E. W. 1985. Simplified procedure for producing *Bacillus subtilis* spores for the guthrie phenylketonuria and other microbiological screening tests. *Journal Clinical Microbiology*. **21** (5): 826-829.

Jordan, R. C. and Jacobs, S. E. 1947. The effect of pH at different temperatures on the growth of *Bacterium coli* with a constant food supply. *Science and Technology*. 15-24.

- Kandalah, R. and M. Ramasamy. 2015. Deproteinization of distillery yeast biomass waste by protease-producing *Bacillus megaterium* PB4. *Bioremediation and Biodegradation*. **6** (6): 1-8.
- Karava, M., Bracharz, F. and Kabisch, J. 2019. Quantification and isolation of *Bacillus subtilis* spores using cell sorting and automated gating. *Plos One*. 1-15.
- Kaur, R. and Tiwari, S. K. 2017. Optimization of culture conditions for bacteriocin production by soil isolates *Pediococcus pentosaceus* LB44 and *Weissell confusa* LM85. *International Journal of Infection*. **4** (3): 1-6.
- Khardziani, T., Sokhadze, K., Kachlishvili, E., Chistyakov, V. and Elisashvili, V. 2017. Optimization of Enhanced probiotic spores production in submerged cultivation of *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. **7** (2): 132–136.
- Koni, T. N. I., Rusman, C. Hanim and Zuprizal. 2017. Effect of pH and temperature on *Bacillus subtilis* FNCC 0059 oxalate decarboxylase activity. *Pakistan Journal Biological Science*. **20** (9): 436–441.
- Konuray, G. and Erginkaya, Z. 2018. Potential use of *Bacillus coagulans* in the food industry. *Foods*. **7** (6): 1-10.
- Kort, R., O'Brien, A. C., Stokkum, I. H. M., Oomes, S. j. C. M., Crielaard, W., Hellingwerf, K. J. and Brul, 2005. Assessment of heat resistance of bacterial spores from food product isolates by fluorescence monitoring of dipicolinic acid release. *Applied and Environmental Microbiology*. **71** (7): 3556-3564.
- Koseki, S. and Itoh, K. 2001. Prediction of microbial growth in fresh-cut vegetables treated with acidic electrolyzed water during storage under various temperature conditions. *Journal of Food Protection*. **64** (12): 1935-1942.
- Kozasa, M. 1989. Probiotics for animal use in Japan. *Review Science Technology Office International*. **8** (2): 517-531.
- Kurniawan, S. B., Purwanti, I. F. and Titah, H. S. 2018. The effect of pH and aluminium to bacteria isolated from aluminium recycling industry. *Journal of Ecological Engineering*. **19** (3): 154-161.
- La-Ragione, R. M., Casula, G., Cutting, S. M. and Wodward, S. M. 2001. *Bacillus subtilis* spores competitively exclude *Escherichia coli* 070:K80 in poultry. *Vetinary Microbiology*. **2062**: 133-142.
- Lai, E. M., Phadke, N. D., Kachman, M. T., Giorno, R., Vazquez, S., Vazques, J. A. Maddock, J. R. and Driks, A. 2003. Proteomic analysis of the spore coats of *Bacillus subtilis* and *Bacillus anthracis*. *Journal Bacteriology*. **185** (4): 1443-1454.
- Latorre, J. D., Hernandez-Velasco, X., Wolfenden, R. E., Vicente, J. L., Wolfenden, A. D., Menconi, A., Bielke, L. R., Hargis, B. M. and Tellez, G. 2016. Evaluation and selection of *Bacillus* species based on enzyme production, antimicrobial activity, and biofilm synthesis as direct-fed microbial candidates for poultry. *Frontiers in Veterinary Sciences*. **3** (195): 1-9.



- Lawrence, Hayley, A. dan Palombo, E. A. 2009. Activity of essential oils against *Bacillus subtilis* spores. *Journal Microbiology Biotechnology*. **19** (12): 1590-1595.
- Leone, S. Sannino, F. Tutino, M. L. Parrilli, E. and Picone, D. 2015. Acetate: friend or foe? Efficient production of a sweet protein in *Escherichia coli* BL21 using acetate as a carbon source. *Microbial Cell Factories*. **14** (1): 1–10.
- Leroi, F., Fall, P. A., Pilet, M. F., Chevalier, F. and Baron, R. 2012. Influence of temperature, pH and NaCl concentration on the maximal growth rate of *Brochothrix thermosphacta* and a bioprotective bacteria *Lactococcus piscium* CNCM- I-4031. *Food Microbiol.* **31** (2): 222-228.
- Lewis, K. 2000. Programmed death in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **64** (3): 503-514.
- Lindsay, J. A., Barton, L. E., Leinart, A. S. and Pankratz, H. S. 1990. The effect of sporulation temperature on sporal characteristics of *Bacillus subtilis* A. *Current Microbiology*. **21** (1): 75-79.
- Liu, Y., Ln, S., Zhang, X., Liu, X., Wang, J. and Lu, F. 2014. A novel approach for improving the yield of *Bacillus subtilis* transglutaminase in heterologous strains. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **41**: 1227 - 1235.
- Liu, K., Chiu, C., Shiu, T., Cheng, W. and Liu, C. 2010. Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. *Fish and Shellfish Immunology*. **28** (5-6): 837-844.
- Liu, B.-L. and Tzeng, Y.-M. 2002. Optimization of growth medium for the production of spores from. *Bioprocess Engineering*. **18** (6): 413-418.
- Loh, T. T., K. Chan., L. Lee and B. Goh. 2016. *Streptomyces* bacteria as potential probiotics in aquaculture. *Frontiers in Microbiology*. **7**: 1-8.
- Long, S. K and Williams, O. B. 1959. Factors affecting growth and spore formation of *Bacillus stearothermophilus*. *Bacteriology University of Texas : Austin*. 625-629.
- Lopez, A. C., J. Minnaard., P. F. Perez and A. M. Alippi. 2013. In vitro interaction between *Bacillus megaterium* strains and Caco-2 cells. *International Microbiology*. **16**: 27-33.
- Lou, I. and Reyes, D. L. III. F. L. 2005. Substrate uptake tests and quantitative fish show differences in kinetic growth of bulking and non-bulking activated sludge. *Biotechnology and Bioengineering*. **92** (6): 729-739.
- Lovdal, I. S., Hovda, M. B., Granum, P. E. and Rosnes, J. T. 2011. Promoting *Bacillus cereus* spore germination for subsequent inactivation by mild heat treatment. *Journal of Food Protection*. **74** (12): 2079-2089.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H., Stahl, D.A and Brock, T. 2014. Brock Biology of Microorganisms, 14th ed. USA. Pearson. 1032 pp.

- Mah, J. H., Kang, D. H. and Tang, J. 2008. Effects of minerals on sporulation and heat resistance of *Clostridium sporogenes*. *International Journal Food Microbiology*. **128** (2): 385-389.
- Manetsberger, J., Ghosh, A., Hall, E. A. H. and Christie, G. 2018. Orthologues of *Bacillus subtilis* Spore crust proteins have a structural role in the *Bacillus megaterium* QM B1551 spore exosporium. *Appl. Environ. Microbiol.* **84** (20): 1–14.
- Manetsberger, J., Manton, J. D., Erdelyi, M. J., Lin, H., Rees, D., Christie, G. and Rees, E. J. 2015. Ellipsoid localization microscopy infers the size and order of protein layers in *Bacillus* spore coats. *Biophysical Journal*. **109**: 2058-2066.
- Mansour, M., Amri, D., Bouttefroy, A., Linder, M., and Milliere, J. B. 1999. Inhibition of *Bacillus licheniformis* spore growth in milk by nisin, monolaurin, and pH combinations. *Journal of Applied Microbiology*. **86**. 311–324.
- Martin, J. D., Werner, B. G. and Hotchkiss, J. H. 2003. Effect of carbon dioxide on bacterial growth parameters in milk as measured by conductivity. *Journal of Dairy Sciences*. **86**: 1932-1940.
- Matz, I. I., Beaman, T. C. and Gerhardt, P. 1970. Chemical composition of exosporium from spores of *Bacillus cereus*. *Journal Bacteriology*. **101** (1): 196-201.
- Mayou, J. L. and Jezeski, J. J. 1977. Effect of sporulation media on the heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Journal of Food Protection*. **40** (4): 232-233.
- Mazas, M., Lopez, M., Gonzalez, I., Bernardo, A. and Martin, R. 1997. Effect of sporulation pH on the resistance and the sporulation of *Bacillus cereus*. *Letters in Applied Microbiology*. **25**: 331-334.
- Martinez, B. A., Stratton, J. and Bianchini, A. 2017. Isolation and genetic identification of spore forming bacteria associated with concentrated milk processing in Nebraska. *Journal Dairy Science*. **100**: 919-932.
- Mather, J. P., and Roberts, P. E. 1998. Introduction to cell and tissue culture: Theory and technique. Plenum Press. New York and London. 215 pp.
- Mckenney, P. T., Driks, A., and Eichenberger, P. 2013. The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nature Reviews Microbiology*. **11**: 33-44.
- Mehnaz, S. 2017. Rhizotrophs: Plant Growth Promotion to Bioremediation (S. Mehnaz, Ed. Singapore. Springer Nature Singapore. 289 pp.
- Membre, J. M., Lepoq, B., Vialette, M. L., Perrier, E. M. L., Thuault, D. and Zwietering, M. 2005. Temperature effect on bacterial growth rate: quantitative microbiology approach including cardinal values and variability estimates to perform growth simulations on/in food. *International Journal of Food Microbiology*. **100** : 179–186

- Menocci, V., Goulart, A. J., Adalberto, P. R., Tavano, O. L., Marques, D. P., Conteiro, J. and Monti, R. 2008. Cyclodextrin glycosyltransferase production by new *Bacillus* isolated from Brazilian soil. *Brazilian Journal of Microbiology*. **39**: 682-688.
- Meylan, S., Porter, C. B. M., Yang, J. H., Balenky, P., Gutierrez, A. Lobritz, M. A., Park, J., Kim, S. H., Moskowitz, S. M. and Collins, J. J. 2017. Carbon sources tune antibiotic susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* via tricarboxylic acid cycle control. *Cellular Chemical Biology*. **24** (2): 195-206.
- Michels, M. J. M. and Visser, E. F. 1976. Occurrence and thermoresistance of spores of psychrophilic and psychrotrophic aerobic sporeformers in soil and foods. *Journal Applied Bacteriology*. **41** (1): 1-11.
- Mikkelsen, D. Flanagan, B. M. Dykes, G. A. & Gidley, M. J. 2019. Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524. *Journal of Applied Microbiology*. **107**(2): 576–583.
- Mingmongkolchai, S. and Panbangred, W. 2018. Bacillus probiotics: an alternative to antibiotics for livestock production. *Journal Applied Microbiology*. **124** (6): 1334-1346.
- Mishra, S., Kumar, P. and Malik, A. 2016. Suitability of agricultural by-product as production medium for spore production by *Beauveria bassiana* HQ917687. *International Journal Recycle Organism Waste Agricultural*. **5**: 179-184.
- Moir, A. and Smith, D. A. 1990. The genetics of bacterial spore germination. *Annual Review Microbiology*. **44**: 531-553.
- Molina-Ramírez, C. Castro, M. Osorio, M. Torres-Taborda, M. Gómez, B. Zuluaga, R. and Castro, C. 2017. Effect of different carbon sources on bacterial nanocellulose production and structure using the low pH resistant strain *Komagataeibacter medellinensis*. *Materials*. **10** (6): 1-13.
- Molle, V., Fujita, M., Jensen, S. T., Eichenberger, P., Gonzalez-pastor, J. E., Liu, J. S and Losick, R. 2003. The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*. **50**: 1683-1701.
- Monteiro, S.M., Clemente J. J, Carrondo, T and Cunha, A. E. 2014. Enhanced spore production of *Bacillus subtilis* grow in a chemically defined medium. *Advances in Microbiology*. **4**: 444–454.
- Monteiro, S. M., Clemente J. J., Henriques., A. O., Gomes, R. J., Carrondo, M. J. and Cunha, A. E. 2005. A procedure for high-yield spore production by *Bacillus subtilis*. *Applied Cellular physiology and Metabolic Engineering*. **21**(4): 627-640.
- Mormak, D. A. and Casida L. 1985. Study of *Bacillus subtilis* endospores in soil by use a modified endospore stain. *Applied Environmental Microbial*. **49** (6):1356-1360.
- Mukhija, B. and Khanna, V. 2018. Isolation, characterization and crystal morphology study of *Bacillus thuringiensis* isolates from soils of Punjab. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. **12** (1): 189-193.

- Muller-Delignette, M. L. 1998. Relation between the generation time and the lag time of bacterial growth kinetics. *International Journal of Food Microbiology*. **43**: 97-104.
- Mulyasari, Widanarni, Suprayudi, M. A., Zairin, M. and Sunarno, M. T. D. 2016. Screening of probiotics from the digestive tract of gouramy (*Osphronemus goramy*) and their potency to enhance the growth of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *AAFL Bioflux*. **9** (5): 1121–1132.
- Munna, S. M., Tahera, J., Afrad, M. M. H., Nur, I. T. and Noor, R. 2015. Survival of *Bacillus* spp. SUBB01 at high temperatures and a preliminary assessment of its ability to protect heat-stressed *Escherichia coli* cells. **8** (637): 1-9.
- Murphy, J. A. and Campbell, L. L. 1969. Surface features of *Bacillus polymyxa* spores as revealed by scanning electron microscopy. *Journal of Bacteriology*. **98** (2): 737-743.
- Mustafa, N. E. M., Keller, U., Malkus, U., Harmsen, D., Reichelt, R., Hussein, A. A. and Sanousi, S. M. E. 2010. Morphological changes induced by wet-heat in *Bacillus cereus* endospores. *Current Research in Bacteriology* **3**(4): 214–226.
- Nakayama, T., Lu, H. and Nomura, N. 2009. Inhibitory effects of *Bacillus* probionts on growth and toxin production of *Vibrio harveyi* pathogens of shrimp. *Letter in Applied Mikrobiology*. **49**: 670-684.
- Neha, A., Kamaljit, S., Ajay, B. and Tarun, G. 2012. Probiotic: as effective treatment of diseases. *International Research Journal of Pharmacy*. **3** (1): 96–101.
- Nguyen, H. T., Nguyen, T.T., Pham, H. T. T., Nguyen, Q. T. N, Tran, M. T., Nguyen, A. H., Phan, T. N., Bui, H. T. V., Dao, H. T. T. and Nguyen, A. T. V. 2018. Fate of carotenoid-producing *Bacillus aquimaris* SH6 colour spores in shrimp gut and their dose-dependent probiotic activities. *PLoS One*. **13** (12): 1-20.
- Nicholson, W. I., Munakata, N., Horne, G., Melosh, H. J. and Setlow, P. 2000. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology Molecular Biology Reviews*. **64** (3): 548-572.
- Nimrat, S. and Vuthiphandchai, V. 2011. In vitro evaluation of commercial probiotic products used for marine shrimp cultivation in Thailand. *African Journal of Biotechnology*. **10** (22): 4643–4650.
- Nur, I. T. Tahera, J. Munna, M. S., Rahman, M. M. and Noor, R. 2016. Impact of Different carbon sources on the in vitro growth and viability of *Escherichia coli* (SUBE01) and *Salmonella* spp. (SUBS01) Cells. *Bangladesh Journal of Microbiology* **1** (2): 39–44.
- Ojkic, N., Lopez-Garrido, J., Pogliano, K. and Endres, R. G. 2016. Cell-wall remodeling drives engulfment during *Bacillus* sporulation. *Computational and Systems Biology, Microbiology and Infectious Disease*. **5**: 1-30.
- Olmos, J. and J. Paniagua-Michel. 2014. *Bacillus subtilis* a potential probiotic bacterium to formulate functional feeds for aquaculture. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*. **6** (7): 361-365.

- Omer, A. M. 2010. Bioformulations of *Bacillus* spores for using as biofertilizer. *Life Science Journal*. **7** (4): 124-131.
- Omran, A., Baker, R. and Coughlin, C. 2013. Differential bacteriostatic effects of sucralose on various species of environmental bacteria. *International Scholarly Research Notices Toxicology*. 1-6.
- Ozusaglam, A. M. 2010. Importance of *Bacillus coagulans* bacterium as probiotic in animal nutrition. *Suleyman Demirel Univ Ziraat Fak. Derg.* **5**: 50-57.
- Painter, P. R. 1975. Generation times of bacteria. *Journal of General Microbiology*. **89**: 217-220.
- Paltridge, B. and A. Phakiti. 2015. Research Methods in Applied Linguistics: A Practical Resource. London. Bloomsbury Academic. 608 pp.
- Pandey, N. K. and Aronson, A. I. 1979. Properties of the *Bacillus subtilis* spore coat. *Journal Bacteriology*. **137** (3): 1208-1218.
- Pandey, K. R dan B.V. Vakil. 2016. Development of bioprocess for high density cultivation yield of the probiotic *Bacillus coagulans* and its spores. *Journal Biology Science Biotechnology*. **5**(2): 173-181.
- Panel, E., Biohaz, H., Andreoletti, O., Baggesen, D. L., Bolton, D., Butaye, P. and Sofos, J. 2013. Scientific opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2013 update). *EFSA Journal*. **11** (11): 1-107.
- Patwary, Y. A., Sarker, B. S., Hossain, M. B., Minar, M. H. and Shamsuddin, M. 2013. Study of mechanical effects on the quality of fish feed during different stages of manufacturing. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. **16** (17): 865-870.
- Piccirillo, S. and Honigberg, S. M. 2010. Sporulation patterning and invasive growth in wild and domesticated yeast colonies. *Research in Microbiology*. **161**: 390-398.
- Pinhal, S., Ropers, D., Geiselmann, J., Jong, H. D. 2019. Acetate metabolism and the inhibition of bacterial growth by acetate. *Journal of Bacteriology*. **201** (13): 1-19.
- Poehlein, A., Gottschalk, G. and Daniel, R. 2013. First Insights into the genome of the gram-negative, endospore-forming organism *Sporomusa ovata* strain h1 dsm 2662. *Genome Announcements*. **1** (5): 5-6.
- Posada-Urbe, L. F. Romero-Tabarez, M. and Villegas-Escobar, V. 2015. Effect of medium components and culture conditions in *Bacillus subtilis* EA-CB0575 spore production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. **38**(10): 1879-1888.
- Powell, B. E and Errington, F, P. 1963. Generation times of individual bacteria : some corroborative measurements. *J. Gen. Microbial*. **31** : 315-327.
- Powell, J. F. 1951. The sporulation and germination of a strain of a strain of *Bacillus megaterium*. *Journal of General Microbiology*. **5**: 993-1000.

- Powell, J. F. and Hunter, J. R. 1955. Spore germination in the genus *Bacillus*: the modification of germination requirements as a result of preheating. *Journal of General Microbiology*. **13**: 56-67.
- Prentice, G. A dan L. F. L. Clegg. 1974. The effect of incubation temperature on the recovery of spores of *Bacillus subtilis* 8051. *Journal Applied Bacteriology*. **37**: 501-613.
- Purnawati, R., Sunarti, T. C., Syamsu, K. and Rahayuningsih, M. 2014. Characterization of novel *Bacillus thuringiensis* isolated from attacus atlas and its growth kinetics in the cultivation media of tofu whey for bioinsecticide production. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*. **4** (16): 33-40.
- Qasim, S., Z. Imtiaz and U. Alvi. 2014. Review of true experimental research studies in applied linguistics. *Research on Humanities and Social Sciences*. **4** (22): 146-149.
- Rajput, A. Q., Khanzada, M. A. and Shahzad, S. 2014. Effect of different substrates and carbon and nitrogen source on growth and shelf life of *Trichoderma pseudokoningii*. *International Journal of Agriculture and Biology*. **16** (5): 893-898.
- Rana, K. J., Siriwardena, S. and Hasan, M. R. 2009. Impact of rising feed ingredient prices on aquafeeds and aquaculture production. In *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*. Rome. FAO. 63 pp.
- Raso, J., Palop, A., Bavarte, M., Condon, S. and Sala, F. J. 1995. Influence of sporulation temperature on the heat resistance of a strain of *Bacillus licheniformis*. *Food Microbiology*. **12**: 357-361.
- Ratkowsky, D. A., Olley, J., McMeekin, T. A. and Ball, A. 1982. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *Journal of Bacteriology*. **149** (1): 1-5.
- Reda, R. M., Selim. K. M., El-Sayed, H. M. and El-Hady, M. A. 2018. In vitro selection and identification of potential probiotics isolated from the gastrointestinal tract of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. **10** (4): 692-703.
- Redmond, C., Baillie, L. W. J., Hibbs, S., Moir, A. J. G. and Moir, A. 2004. Identification of proteins in the exosporium of *Bacillus anthracis*. *Microbiology*. **150** (2): 335-363.
- Ren, H., Su, Y. and Guo, X. 2018. Rapid optimization of spore production from *Bacillus amyloliquefaciens* in submerged cultures based on dipicolinic acid fluorimetry assay. *AMB Express*. **8** (21): 1-9.
- Rey, C. R., Walker, B. W. and Rohrbaugh, P. L. 1975. The influence of temperature on growth, sporulation and heat resistance of spores of six strains of *Clostridium perfringens*. *Journal Milk Food Technology*. **38** (8): 461-465.
- Robl, D., Sung, L. B., Novakovich, J. H., Marangoni, P. R. D., Zawadneak, M. A. C., Dalzoto, P. R., Gabardo, J. and Pimentel, I. C. 2009. *Brazilian Journal of Microbiology*. **40**: 296-300.

- Rodrigues, M. I. and A. F. Lemma. 2015. *Experimental Design and Process Optimization*. Boca Raton. CRC Press. 336 pp.
- Salazar-Magallon, J. A., Hernandez-Velazquez, V. M., Alvear-Garcia, A., Arenas-Sosa, I. and Pena-Chora, G. 2015. Evaluation of industrial by-products for the production of *Bacillus thuringiensis* strain GP139 and the pathogenicity when applied to *Bemisia tabaci* nymphs. *Bulletin of Insectology*. **68** (1): 103–109.
- Salminen, S., A. von Wright and A. Ouwehand. 2004. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. Marcel Dekker, Inc. New York. 629 p.
- Sang-Wook, L and Sim, S. J. 2006. Increased heat resistance of *Geobacillus stearothermophilus* spores heat shocked during sporulation. *Journal Microbiology*. **16**(4):633-636.
- Santivarangkna, C., Higl, B. and Foerst, P. 2008. Protection mechanisms of sugars during different stages of preparation process of dried lactic acid starter cultures. *Food Microbiology*. **25** (3): 429–441.
- Santos, V. L and Linardi, V. R. 2004. Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents identification and degradation potential. *Process Biochemical*. **39**: 1001-1006.
- Santos-Villalobos, S. D. L., Hernandez-Rodriguez, L. E., Villasenor-Ortega, F. and Pena-Cabriale, J. J. 2012. Production of *Trichoderma asperellum* T8a spores by home-made solid state fermentation of mango industrial wates. *Bioresources*. **7** (4): 4938-4951.
- Sarrafzadeh, M. H. 2012. Nutritional requirements of *Bacillus thuringiensis* during different phases of growth, sporulation and germination evaluated by Plackett-Burman method. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*. **31** (4): 131–136.
- Sarudu, N. H., Selaman, O. S., Bains, R. and Rosli, N. A. 2015. Evaluation on factors affecting bacteria growth in collected rainwater. *Journal of Civil Engineering, Science and Technology*. **6** (2): 11-17.
- Schultz, D. and Kishony, R. 2013. Optimization and control in bacterial lag phase. *Bio Med Central Biology*. **11**: 1-3.
- Sella, S. R. B. R., Vandenberghe, L. P. S. and Soccol, C. R. 2014. Life cycle and spore resistance of spore-forming *Bacillus atrophaeus*. *Microbiological Research*. **169** (12): 931–939.
- Setlow, B., Atluri, S., Kitchel, R., Koziol-Dube, K. and Setlow, P. 2006. Role of dipicolinic acid in resistance and stability of spores of *Bacillus subtilis* with or without DNA-protective  $\alpha/\beta$ -type small acid-soluble proteins. *Journal of Bacteriology*. **188** (11): 3740–3747.
- Setlow, P. 2003. Spore germination. *Current Opinion in Microbiology*. **6** (6): 550–556.

- Setlow, P. 2006. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology*. **101** (3): 514-525.
- Setlow, P. 2014. Germination of spores of *Bacillus* species: what we know and do not know. *Journal of Bacteriology*. **196** (7): 1297-1305.
- Shakoor, S., Aftab, S. and Rehman, A. 2013. Characterization of cellulose degrading bacterium, *Bacillus megaterium* S3, isolated from indigenous environment. *Pakistan Journal Zoology*. **45** (6): 1655-1662.
- Shefat, S. H. T. 2018. Probiotic strains used in aquaculture. *International Research Journal*. **8** (2): 43-55.
- Shehata, T. E. and Marr, A. G. 1971. Effect of nutrient concentration on the growth of *Escherichia coli*. **107** (1): 210-216.
- Shmeis, R. M. A. 2018. Water chemistry and microbiology. *Comprehensive Analytical Chemistry*. **81**: 1-56.
- Shojaaddini, M., Moharrampour, S., Khodabandeh, M. and Talebi, A. 2010. Development of a cost effective medium for production of *Bacillus Thuringiensis* bioinsecticide using food barley. *Journal of Plant Protection Research*. **50** (1): 9-14.
- Singh, A., Shahid, M., Srivastava, M., Pandey, S., Sharma, A. and Kumar, V. 2014. Optimal physical parameters for growth of *Tricoderma* species at varying pH, temperatur and agitation. *Virology and Micology*. **3** (1): 1-7.
- Sinnela, M. T., Park, Y. K., Lee, J. H., Jeong, K. C., Kim, Y., Hwang, H. and Mah, J. 2019. Effects of calcium and manganase on sporulation of *Bacillus* species involved in food poisoning and spoilage. *Foods*. **8** (119): 1-9.
- Slonczewski, J. L., Fujisawa, M., Dopson, M. and Krulwich, T. A. 2009. Cytoplasmic pH measurement and homeostasis in Bacteria and Archaea. *Advances in Microbial Physiology*. **55**: 1-79.
- Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2*. USA. Williams and Wilkins. 965-1599.
- Soni, A., Oey, I., Silcock, P. and Bremer, P. 2016. *Bacillus* spores in the food industry: a review on resistance and response to novel inactivation technologies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **15** (6): 1139-1148.
- Sorokulova, I. 2013. Modern status and perspectives of *Bacillus* Bacteria as Probiotics. *Journal Probiotic Health*. **1** (4): 1-5.
- Soro-Yao, A. A., Aka, S., Thonart, P. and Dje, K. M. 2014. Assessment of the potential of Lactic Acid Bacteria as dried starter culture for cereal fermentation. *The Open Biotechnology Journal*. **8**: 1-5.
- Standar Nasional Indonesia (SNI). 2006. Cara uji mikrobiologi-bagian 3: Penentuan Angka Lempeng Total (ALT) pada Produk Perikanan. Badan Standar Nasional SNI 01-2332.3. 11 hlm.



- Stecchini, M. L., Del Torre, M., Donda, S. and Maltini, E. 2000. Growth of *Bacillus cereus* on solid media as affected by sodium chloride and potassium sorbate. *Journal of Food Protection*. **63** (7): 926-929.
- Sura, N. K. and Hiremath, L. 2009. Isolation of *Bacillus megaterium* and its commercial importance. *International Journal of ChemTech Research*. **12** (4): 30-36.
- Surudu, N. H., Seleman, O. S., Bains, R. and Rosli, N. A. 2015. Evaluation on factors affecting bacteria growth in collected rain water. *Journal of Civil Engineering, Science and Technology*. **6** (2): 11-17.
- Swick, M. C., Koehler, T. M. and Driks, A. 2016. Surviving between hosts: sporulation and transmission. *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens, Fifth Edition*. **4** (4): 529–566.
- Swinnen, I. A. M., Bernaerts, K., Dens, E. J. J., Geeraerd, A. H., Van Impe, J. F. 2004. Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. *International Journal of Food Microbiology*. **94**: 137-159.
- Tan, I. S. and Ramamurthi, K. S. 2014. Spore formation in *Bacillus subtilis*. *Environmental Microbiology Reports*. **6** (3): 212-225.
- Taxis, C., Keller, P., Kavagiou, Z., Jensen, L. J., Colombelli, J., Bork, P., Stelzer, E. H. K. and Knop, M. 2005. Spore number control and breeding in *Saccharomyces cerevisiae*: a key role for a self-organizing system. *The Journal of Cell Biology*. **171** (4): 627-640.
- Terpou, A., Papadaki, A., Lappa, I. K., Kachimanidou, V., Bosnea, L. A. and Kopsahelis, N. 2019. Probiotics in food systems: significance and emerging strategies towards improved viability and delivery of enhanced beneficial value. *Nutrients*. **11**: 1-32.
- Tirloni, E., Ghelardi, E., Celandroni, F., Bernardi, C. and Stella, S. 2017. Effect of dairy product environment on the growth of *Bacillus cereus*. *Journal Dairy Science*. **100**: 7026-7034.
- Touratier, F., Legendre, L. and Vezina, A. 1999. Model of bacterial growth influenced by substrate C:N ratio and concentration. *Aquatic Microbial Ecology*. **19**: 105-118.
- Trunet, C. Mtimet, N., Mathot, A. G., Postollec, F., Leguerinel, I., Sohler, D., Couvert, O., Carlin, F., Coroller, L. 2015. Modelling the recovery of heat-treated *Bacillus licheniformis* Ad978 and *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores at suboptimal temperature and pH using growth limits. *Applied and Environmental Microbiology*. **81** (2): 562-568.
- Tyagi, N. and Suresh, S. 2016. Production of cellulose from sugarcane molasses using *Gluconacetobacter intermedium* SNT-1: optimization and characterization. *Journal of Cleaner Production*. **112**: 71-80.
- Ubong, U. New, C. Y. Chai, L. C. A., N. F. K., N. H., Nishibuchi, M. and R., S. 2019. Impact of temperature on *Bacillus cereus* spore germination in ultra-high temperature chocolate milk. *Food Research*. **3**: 808–813.

- Ulrich, N., Nagler, K., Laue, M., Cockell, C. S. and Setlow, P. 2018. Experimental studies addressing the longevity of *Bacillus subtilis* spores- the first data from a 500-year experiment. *Plos One*. **13** (12): 1-14.
- Umeda, A. and Amako, K. 1980. Spore outgrowth and the development of flagella in *Bacillus subtilis*. *Journal of General Microbiology*. **118**: 215-221.
- Uono, M., Hacker, S., Stephano, M. A., Viana, V. C., Manfrinato, C. V. and Bogsan, C. S. B. 2019. Technological development of biomass and the challenge of complete and efficient sporulation of *Bacillus coagulans* BVV5. *Chemical Engineering Transactions*. **75**: 457-462.
- Vandenbergh, L. P. S., Soccol, C. R., Pandey, A. and Lebeault. 1999. J. Microbial production of citric acid. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. **42** (3): 1-14.
- Van Heerden, J. H., Kempe, H., Doerr, A., Marrleveld, T., Nordholt, N. and Bruggeman, F. J. 2017. Statistics and simulation of growth of single bacterial cells: illustrations with *B. subtilis* and *E. coli*. *Scientific Reports*. **7**: 1-11.
- Valicente, F. H., E. D. S. Tuelher., M. I. S. Leite., F. L. Freire and C. M. Vieira. 2008. Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticide using commercial lab medium and agricultural by-products as nutrient sources. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*. **9** (1): 1-11.
- Vartoukian, S. R. 2016. Cultivation strategies for growth of uncultivated bacteria. *Journal Oral Bioscience*. **58** (4): 142-149.
- Vary, P. S., Biedendieck, R., Fuerch, T., Meinhardt, F., Rohde, M., Deckwer, W., Jahn, D. 2007. *Bacillus megaterium*-from simple soil bacterium to industrial protein production host. *Applied Microbiology Biotechnology*. **76**: 957-967.
- Vega, M. C. 2016. Advanced Technologies for Protein Complex Production and Characterization. Center for Biological Research, Madrid, Spain. Springer. p 99.
- Venugopal, R. J. and Dickson, J. S. 1999. Growth rates of mesophilic bacteria, aerobic psychrotrophic bacteria, and lactic acid bacteria in low-dose-irradiated pork. *Journal of Food Protection*. **62** (11): 1297-1302.
- Verdin, A., Sahraoui, A. L. and Durand, R. 2004. Degradation of benzo(a)pyrene by mitosporic fungi and extracellular oxidative enzyme. *International Biodeter Biodegradation*. **53**: 65-70.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **64** (4): 655-671.
- Vreeland, R. H., William, D., Rosenzweig and Powers, D. W. 2000. Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Letters to nature*. **407**: 897-900.
- Walker, C. R. Rey and Rohrbaugh, P. L. 1975. The influence of temperature on growth, sporulation, and heat resistance of spores of six strains of *Clostridium Perfringens*. *Journal Milk Food Technology*. **38** (8): 461-465.

Wambeke, F. V., Bonnet, S., Moutin, T., Raimbault, P., Alarcon, G. and C. Guieu. 2008. Factors limiting heterotrophic bacterial production in the southern Pacific Ocean. *Biogeosciences*. **5**: 833-845.

Wang, X. Xia, K. Yang, X. and Tang, C. 2019. Growth strategy of microbes on mixed carbon sources. *Nature Communications*. **10** (1): 1–7.

Wangka-Orm, C., Deeseenthu, S. and Leelavatch, V. 2014. Low Cost medium for spore production of *Bacillus kku02* and *kku03* and the effects of the produced spores on growth of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Man). *Pakistan Journal of Biological Sciences*. **17** (8): 1015–1022.

Warth, A. D., Ohye, D. F., Murrel W. G. 1963. The composition and structure of bacteria spore. *Journal Cell Biology*. **16**: 579-592.

Williams, F. M. 1967. A model of Cell growth dynamics. *Journal of Theoretical Biology*. **15**: 190-207.

Wolken, W. A. M., Tramper, J. and Van Der Werf, M. J. 2003. What can spores do for us?. *Trends in Biotechnology*. **21** (8): 338–345.

Wong, H. C and Chen, L. Y. 1988. Effects of lactic acid bacteria and organic acids on growth and germination of *Bacillus cereus*. *Environmental Microbiology*. **54** (9) : 2179-2184

Wu, L. J. and Errington, J. 1994. *Bacillus subtilis* SpoIIIE protein required for DNA segregation during asymmetric cell division. *Science*. **264**: 572-575.

Wu, R., Chen, G., Pan, S., Zeng, J. and Liang, Z. 2019. Cost-effective fibrinolytic enzyme production by *Bacillus subtilis* WR350 using medium supplemented with corn steep powder and sucrose. *Scientific Reports*. **9** (6824): 1-10.

Wunderlin, T., Junier, T., Paul, C., Jeanneret, N. and Junier, P. 2016. Physical isolation of endospores from environmental samples by targeted lysis of vegetative cells. *Journal of Visualized Experiments*. **107**: 1-7.

Xenopoulos, P. and Piggot, P. J. 2011. Regulation of growth of the mother cell and chromosome replication during sporulation of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*. **193** (12): 3117-3126.

Yadzani, M., Pirdashti, H. Bahmanyar, M. A. and Esmaili, M. A. 2009. Effect of phosphate solubilization microorganism (SM) and plant growth promoting rhizobacter (GPR) on yield and yield components of corn. *World Academy Science Engineering Technology*. **37**: 90-92.

Yazdany, S. and Laskhari, K. B. 1975. Effect of pH on sporulation of *Bacillus stearothermophilus*. *Applied Microbiology*. **30** (1): 1-3.

Yan, S., Mohammedi, S., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y. and Valero, J. R. 2007. Growth of four serovar of *Bacillus thuringiensis* (var. *kurstaki*, *israelensis*, *tenebrionis*, and *aizawai*) in wastewater sludge. *Practice Periodical of Hazardous, Toxic and Radioactive Waste Management*. **11** (2): 123-129.

Yuniarti, A., N. B. Arifin., M. Fakhri and A. M. Hariati. 2019. Effect of C:N ratio on the spore production of *Bacillus* sp. Indigenous shrimp pond. *Earth and Environmental Science*. **236**: 1-6.

Yuksekdag, Z. N. and Aslim, B. 2008. Influence of different carbon sources on exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* Subsp. bulgaricus (B3, G12) and *Streptococcus thermophilus* (W22). *Brazilian Archives of Biology and Technology*. **51**(3): 581–585.

Zhang, P., Thomas, S., Li, Y. and Setlow, P. 2012. Effect of cortex peptidoglycan structure and cortex hydrolysis on the kinetics of  $\text{Ca}^{2+}$  dipicolinic acid release during *Bacillus subtilis* spore germination. *Journal of bacteriology*. **194**: 646–652.

Zhang, X., Wang, Y., Guo, J., Yu, Y., Jia, L., Guo, Y. and Liu, C. 2015. Comparing two functions for optical density and cell numbers in bacterial exponential growth phase. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. **9** (1): 299–305.

Zhao, S., Hu, N., Huang, J., Liang, Y. and Zhao, B. 2008. High-yield spore production from *Bacillus licheniformis* by solid state fermentation. *Biotechnology Letters*. **30** (2): 295–297.

Zhellmer-Bruhn, M., Caligiuri, P. and Thomas, D. C. 2016. From the editors: experimental designs international business research. *Journal of International Business Studies*. **47**: 399–407.



GLOSARIUM

D

*Dipicolinic Acid (DPA)* : senyawa kimia penyusun inti spora yang terdiri dari 5 sampai 15% berat kering dari spora bakteri.

E

*Exosporium* : lapisan permukaan luar spora bakteri yang telah matang.

F

Fase adaptasi : fase penyesuaian bakteri terhadap kondisi lingkungan yang baru.

Fase eksponensial : fase tercapainya sel maksimum dari suatu bakteri yang disebabkan karena proses pembelahan.

Fase Stasioner : fase dimana laju pertumbuhan bakteri sama dengan laju kematiannya.

G

Germinasi : proses spora kembali menjadi sel vegetatif pada kondisi lingkungan yang terdapat nutrisi baru.

L

Laju pertumbuhan spora : Pertambahan populasi spora pada waktu tertentu.



Laju pertumbuhan vegetatif : Pertumbuhan sel vegetatif pada waktu tertentu.

Sel vegetatif : organisme mikroskopik yang memiliki sel tunggal dan tidak mempunyai selubung inti.

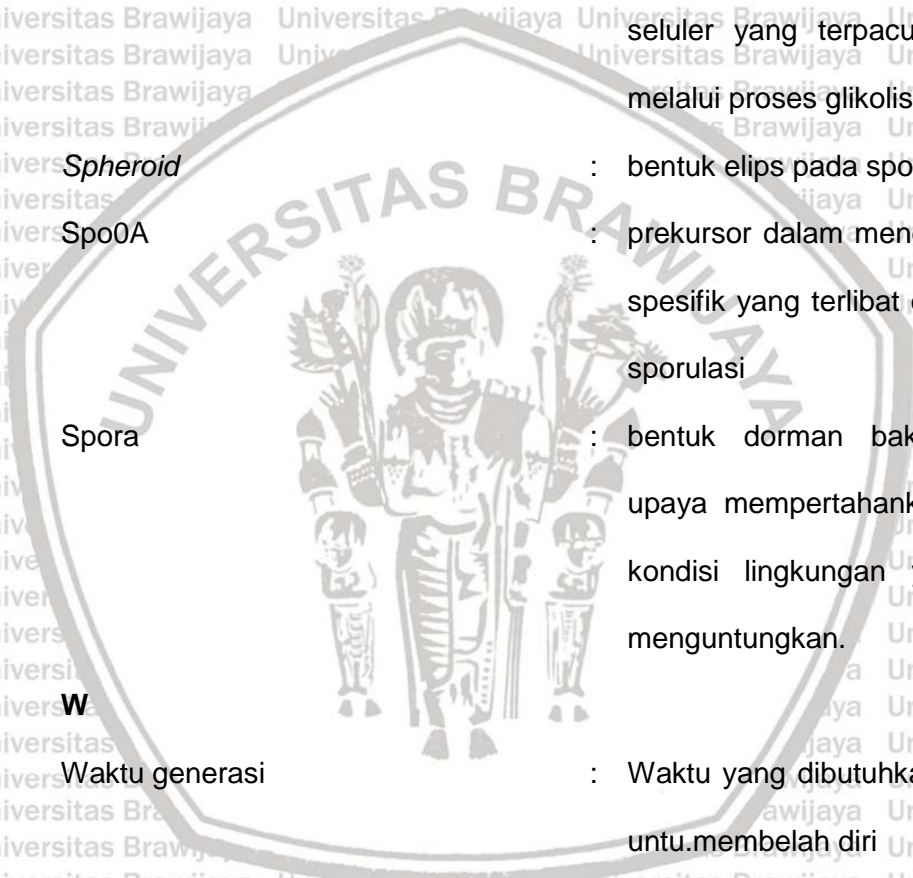
Siklus TCA : reaksi metabolisme pernapasan seluler yang terpacu oleh enzim melalui proses glikolisis.

Spheroid : bentuk elips pada spora *Bacillus*

Spo0A : prekursor dalam mengaktifkan gen spesifik yang terlibat dalam proses sporulasi

Spora : bentuk dorman bakteri sebagai upaya mempertahankan diri pada kondisi lingkungan yang kurang menguntungkan.

Waktu generasi : Waktu yang dibutuhkan sel bakteri untuk membelah diri



LAMPIRAN

Lampiran 1. Alat-Alat Penelitian yang Digunakan



Oven



Autoklaf



Kulkas



Spektrofotometer



Hot Plate



Timbangan Digital



Vortex Mixer



Bunsen



Erlenmeyer

Lampiran 1. Alat-alat Penelitian yang Digunakan (Lanjutan)



Gelas Ukur



Beaker Glass



Rak Tabung Reaksi



Bola Hisap



Blue Tip



Pipet Volume



Tabung Reaksi



Nampan



Sprayer



Lampiran 1. Alat-alat Penelitian yang Digunakan (Lanjutan)



Timbangan Analitik



Spatula



Termometer Hg



Laminary Air Flow



Mikropipet



Incubator Shaker



Falcon



Haemocytometer



Test Tube

## Lampiran 2. Bahan Penelitian yang Digunakan



Akuades



Alkohol 70%



Alumunium Foil



Media NB



Benang Kasur



Plastik Wrap



Kertas Label



Kapas



Hydrobath

Lampiran 2. Bahan Penelitian yang Digunakan (Lanjutan)



Sarung Tangan



Tisu



Malachite Green



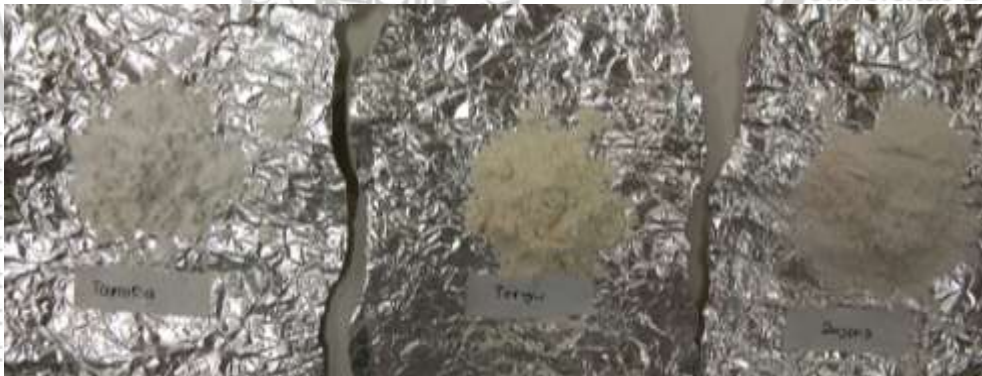
HCL 0,1N



NaOH 0,1N



Safranin



Tepung

Lampiran 3. Dokumentasi Kegiatan



Pengukuran pH di Media



Preparasi SEM



Kudran 4



Pewarnaan Bakteri



Penimbangan Media



Uji Media Tumbuh Spora Padat



Pembuatan Larutan Stok



Pengamatan pada Haemocytometer



Penelitian perbedaan media dan dosis karbon

## Lampiran 3. Dokumentasi Kegiatan



Pemanasan Spora



Pengukuran OD



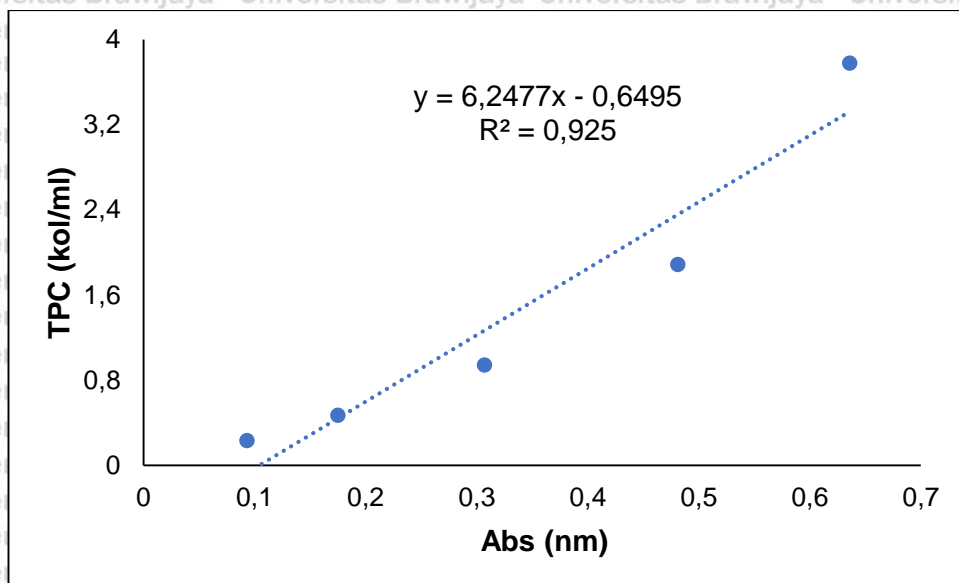
Penyemprotan media uji



Pengambilan sampel germinasi



Pengenceran sampel sebelum diamati di mikroskop

Lampiran 4. Kurva *Optical Density B. megaterium*

- Absorbansi

OD 1 = 0,64

OD 2 = 0,48

OD 3 = 0,31

OD 4 = 0,18

OD 5 = 0,09

- TPC ( $\times 10^8$ )

TPC 1 = 3,78

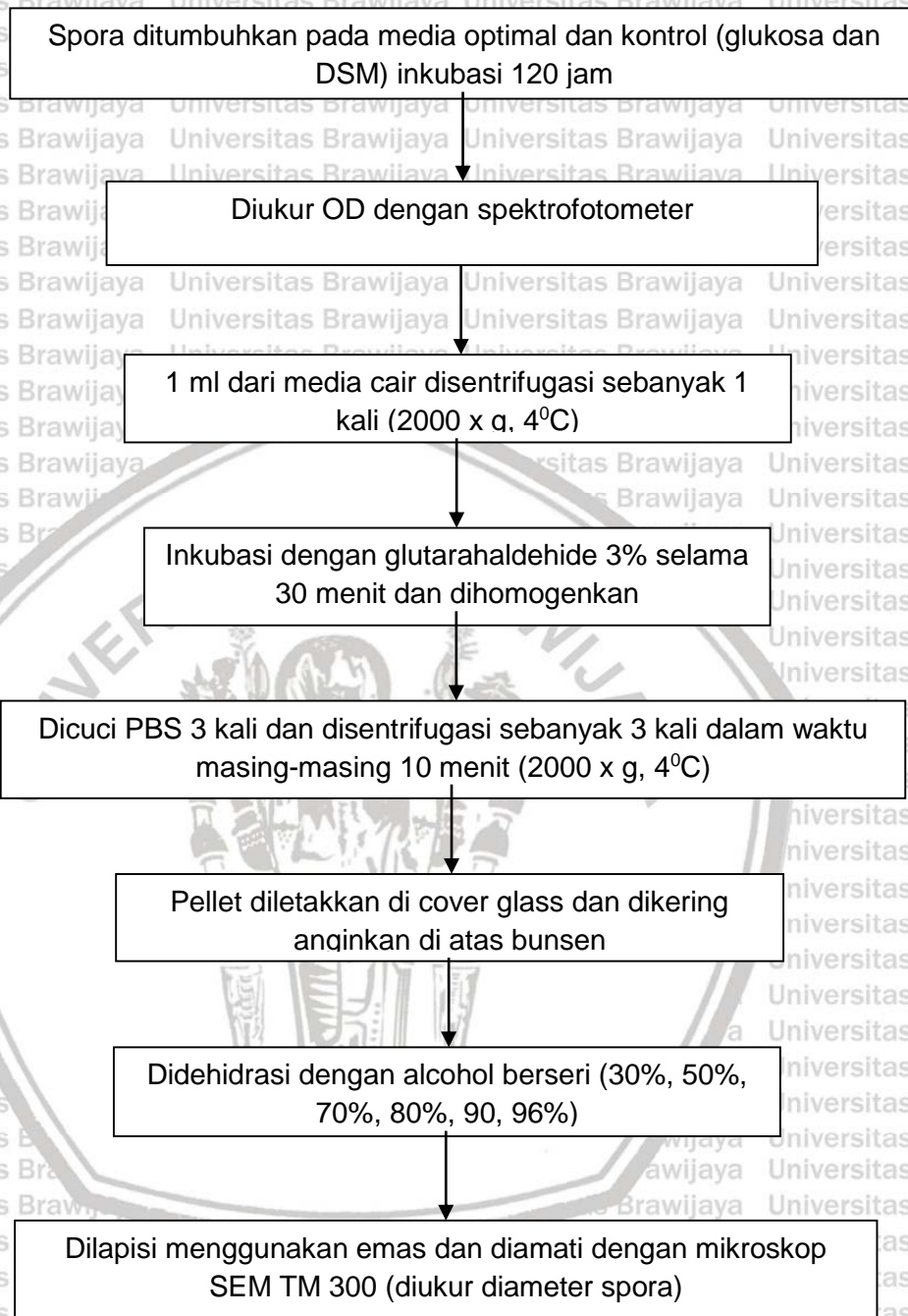
TPC 2 = 1,89

TPC 3 = 0,95

TPC 4 = 0,47

TPC 5 = 0,24



**Lampiran 5. Prosedur Pengujian SEM spora *B. megaterium***

## Lampiran 6. Data Hasil Statistik Menggunakan Aplikasi SPSS

## A) Tahap 1 (Perbedaan Media dan Dosis Karbon)

Produksi Sel Vegetatif *B. megaterium* 5 jam

## Between-Subjects Factors

	Value	Label	N
Media	1,00	Tepung Tapioka	12
	2,00	Tepung Terigu	12
	3,00	Tepung Jagung	12
Dosis	1,00	Dosis 5 g/l	9
	2,00	Dosis 10 g/l	9
	3,00	Dosis 15 g/l	9
	4,00	Dosis 20 g/l	9

## Descriptive Statistics

Dependent Variable: Sel Vegetatif

Media	Dosis	Mean	Std. Deviation	N
Tepung Tapioka	Dosis 5 g/l	,4033	,01155	3
	Dosis 10 g/l	,4467	,01155	3
	Dosis 15 g/l	,3833	,00577	3
	Dosis 20 g/l	,4633	,01528	3
	Total	,4242	,03502	12
Tepung Terigu	Dosis 5 g/l	1,3000	,00000	3
	Dosis 10 g/l	1,3000	,00000	3
	Dosis 15 g/l	1,5000	,00000	3
	Dosis 20 g/l	1,4000	,00000	3
	Total	1,3750	,08660	12
Tepung Jagung	Dosis 5 g/l	,1800	,00000	3
	Dosis 10 g/l	,2100	,00000	3
	Dosis 15 g/l	,2000	,00000	3
	Dosis 20 g/l	,2200	,01000	3
	Total	,2025	,01603	12
Total	Dosis 5 g/l	,6278	,51339	9
	Dosis 10 g/l	,6522	,49656	9
	Dosis 15 g/l	,6944	,60937	9
	Dosis 20 g/l	,6944	,53963	9
	Total	,6672	,51853	36



### Lampiran 6. Data Hasil Statistik Menggunakan Aplikasi SPSS (Lanjutan)

#### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Sel Vegetatif

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	9,409 <sup>a</sup>	11	,855	16207,675	,000
Intercept	16,027	1	16,027	303663,368	,000
Faktor_A	9,312	2	4,656	88218,053	,000
Faktor_B	,029	3	,010	185,474	,000
Faktor_A * Faktor_B	,068	6	,011	215,316	,000
Error	,001	24	5,278E-5		
Total	25,437	36			
Corrected Total	9,411	35			

a, R Squared = 1,000 (Adjusted R Squared = 1,000)

#### Sel Vegetatif 5 Jam

Duncan<sup>a,b</sup>

Media	N	Subset		
		1	2	3
Tepung Jagung	12	,2025		
Tepung Tapioka	12		,4242	
Tepung Terigu	12			1,3750
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed,

Based on observed means,

The error term is Mean Square(Error) = 5,278E-5,

a, Uses Harmonic Mean Sample Size = 12,000,

b, Alpha = ,05,

#### Sel Vegetatif 5 Jam

Duncan<sup>a,b</sup>

Dosis	N	Subset		
		1	2	3
Dosis 5 g/l	9	,6278		
Dosis 10 g/l	9		,6522	
Dosis 20 g/l	9			,6944
Dosis 15 g/l	9			,6944
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed,

Based on observed means,

The error term is Mean Square(Error) = 5,278E-5,

a, Uses Harmonic Mean Sample Size = 9,000,

b, Alpha = ,05,

## Lampiran 6. Data Hasil Statistik Menggunakan Aplikasi SPSS (Lanjutan)

Produksi Sel Vegetatif *B. megaterium* 10 jam

## Between-Subjects Factors

	Value	Label	N
Media	1,00	Tepung Tapioka	12
	2,00	Tepung Terigu	12
	3,00	Tepung Jagung	12
Dosis	1,00	Dosis 5 g/l	9
	2,00	Dosis 10 g/l	9
	3,00	Dosis 15 g/l	9
	4,00	Dosis 20 g/l	9

## Descriptive Statistics

Dependent Variable: Sel Vegetatif

Media	Dosis	Mean	Std, Deviation	N
Tepung Tapioka	Dosis 5 g/l	,0493	,00115	3
	Dosis 10 g/l	,0560	,00173	3
	Dosis 15 g/l	,0830	,00173	3
	Dosis 20 g/l	,0703	,00153	3
	Total		,0647	,01367
Tepung Terigu	Dosis 5 g/l	1,2000	,00000	3
	Dosis 10 g/l	1,4667	,05774	3
	Dosis 15 g/l	1,7000	,00000	3
	Dosis 20 g/l	1,6000	,00000	3
	Total		1,4917	,19752
Tepung Jagung	Dosis 5 g/l	,0297	,00058	3
	Dosis 10 g/l	,0367	,00058	3
	Dosis 15 g/l	,0340	,00000	3
	Dosis 20 g/l	,0283	,00058	3
	Total		,0322	,00351
Total	Dosis 5 g/l	,4263	,58031	9
	Dosis 10 g/l	,5198	,71080	9
	Dosis 15 g/l	,6057	,82102	9
	Dosis 20 g/l	,5662	,77555	9
	Total		,5295	,69901

### Lampiran 6. Data Hasil Statistik Menggunakan Aplikasi SPSS (Lanjutan)

#### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Sel Vegetatif

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	17,095 <sup>a</sup>	11	1,554	5576,807	,000
Intercept	10,093	1	10,093	36220,080	,000
Faktor_A	16,670	2	8,335	29910,470	,000
Faktor_B	,161	3	,054	192,572	,000
Faktor_A *	,264	6	,044	157,703	,000
Faktor_B					
Error	,007	24	,000		
Total	27,195	36			
Corrected Total	17,101	35			

a. R Squared = 1,000 (Adjusted R Squared = ,999)

#### Sel Vegetatif 10 Jam

Duncan<sup>a,b</sup>

Media	N	Subset		
		1	2	3
Tepung Jagung	12	,0322		
Tepung Tapioka	12		,0647	
Tepung Terigu	12			1,4917
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed,

Based on observed means,

The error term is Mean Square(Error) = ,000,

a, Uses Harmonic Mean Sample Size = 12,000,

b, Alpha = ,05,

#### Sel Vegetatif 10 Jam

Duncan<sup>a,b</sup>

Dosis	N	Subset			
		1	2	3	4
Dosis 5 g/l	9	,4263			
Dosis 10 g/l	9		,5198		
Dosis 20 g/l	9			,5662	
Dosis 15 g/l	9				,6057
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed,

Based on observed means,

The error term is Mean Square(Error) = ,000,

a, Uses Harmonic Mean Sample Size = 9,000,

b, Alpha = ,05,

## Lampiran 6. Data Hasil Statistik Menggunakan Aplikasi SPSS (Lanjutan)

- Produksi Sel Vegetatif *B. megaterium* 18 jam

## Between-Subjects Factors

	Value	Label	N
Media	1,00	Tepung Tapioka	12
	2,00	Tepung Terigu	12
	3,00	Tepung Jagung	12
Dosis	1,00	Dosis 5 g/l	9
	2,00	Dosis 10 g/l	9
	3,00	Dosis 15 g/l	9
	4,00	Dosis 20 g/l	9

## Descriptive Statistics

Dependent Variable: Sel Vegetatif

Media	Dosis	Mean	Std. Deviation	N
Tepung Tapioka	Dosis 5 g/l	,0460	,00100	3
	Dosis 10 g/l	,0473	,00153	3
	Dosis 15 g/l	,0740	,00265	3
	Dosis 20 g/l	,0633	,00289	3
	Total	,0577	,01229	12
Tepung Terigu	Dosis 5 g/l	1,0000	,00000	3
	Dosis 10 g/l	1,3000	,00000	3
	Dosis 15 g/l	1,5000	,00000	3
	Dosis 20 g/l	,5500	,01000	3
	Total	1,0875	,37366	12
Tepung Jagung	Dosis 5 g/l	,0403	,00058	3
	Dosis 10 g/l	,0527	,00058	3
	Dosis 15 g/l	,0590	,00100	3
	Dosis 20 g/l	,0670	,00000	3
	Total	,0548	,01020	12
Total	Dosis 5 g/l	,3621	,47842	9
	Dosis 10 g/l	,4667	,62500	9
	Dosis 15 g/l	,5443	,71678	9
	Dosis 20 g/l	,2268	,24248	9
	Total	,4000	,53578	36

### Lampiran 6. Data Hasil Statistik Menggunakan Aplikasi SPSS (Lanjutan)

#### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Sel Vegetatif

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	10,047 <sup>a</sup>	11	,913	91082,831	,000
Intercept	5,759	1	5,759	574324,657	,000
Faktor_A	8,509	2	4,254	424249,083	,000
Faktor_B	,510	3	,170	16968,283	,000
Faktor_A *	1,028	6	,171	17084,688	,000
Faktor_B					
Error	,000	24	1,003E-5		
Total	15,806	36			
Corrected Total	10,047	35			

a, R Squared = 1,000 (Adjusted R Squared = 1,000)

#### Sel Vegetatif 18 Jam

Duncan<sup>a,b</sup>

Media	N	Subset		
		1	2	3
Tepung Jagung	12	,0548		
Tepung Tapioka	12		,0577	
Tepung Terigu	12			1,0875
Sig,		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed,

Based on observed means,

The error term is Mean Square(Error) = 1,003E-5,

a, Uses Harmonic Mean Sample Size = 12,000,

b, Alpha = ,05,

#### Sel Vegetatif 18 Jam

Duncan<sup>a,b</sup>

Dosis	N	Subset			
		1	2	3	4
Dosis 20 g/l	9	,2268			
Dosis 5 g/l	9		,3621		
Dosis 10 g/l	9			,4667	
Dosis 15 g/l	9				,5443
Sig,		1,000	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed,

Based on observed means,

The error term is Mean Square(Error) = 1,003E-5,

a, Uses Harmonic Mean Sample Size = 9,000,

b, Alpha = ,05,

## Lampiran 6. Data Hasil Statistik Menggunakan Aplikasi SPSS (Lanjutan)

Produksi spora *B. megaterium* 36 jam

## Between-Subjects Factors

	Value	Label	N
Media	1,00	Tepung Tapioka	12
	2,00	Tepung Terigu	12
	3,00	Tepung Jagung	12
Dosis	1,00	Dosis 5 g/l	9
	2,00	Dosis 10 g/l	9
	3,00	Dosis 15 g/l	9
	4,00	Dosis 20 g/l	9

## Descriptive Statistics

Dependent Variable: Kepadatan Spora

Media	Dosis	Mean	Std. Deviation	N
Tepung Tapioka	Dosis 5 g/l	,0147	,00058	3
	Dosis 10 g/l	,0177	,00058	3
	Dosis 15 g/l	,0157	,00493	3
	Dosis 20 g/l	,0130	,00520	3
	Total		,0153	,00355
Tepung Terigu	Dosis 5 g/l	,6900	,01000	3
	Dosis 10 g/l	,7400	,02646	3
	Dosis 15 g/l	1,1000	,00000	3
	Dosis 20 g/l	,7033	,01528	3
	Total		,8083	,17745
Tepung Jagung	Dosis 5 g/l	,0120	,00000	3
	Dosis 10 g/l	,0107	,00058	3
	Dosis 15 g/l	,0120	,00100	3
	Dosis 20 g/l	,0040	,00265	3
	Total		,0097	,00368
Total	Dosis 5 g/l	,2389	,33837	9
	Dosis 10 g/l	,2561	,36317	9
	Dosis 15 g/l	,3759	,54309	9
	Dosis 20 g/l	,2401	,34753	9
	Total		,2778	,39331

Lampiran 6. Data Hasil Statistik Menggunakan Aplikasi SPSS (Lanjutan)

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: Kepadatan Spora

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	5,412 <sup>a</sup>	11	,492	5398,344	,000
Intercept	2,777	1	2,777	30472,417	,000
Faktor_A	5,068	2	2,534	27801,102	,000
Faktor_B	,117	3	,039	428,786	,000
Faktor_A *	,227	6	,038	415,536	,000
Faktor_B					
Error	,002	24	9,114E-5		
Total	8,191	36			
Corrected Total	5,414	35			

a. R Squared = 1,000 (Adjusted R Squared = ,999)

**Kepadatan Spora 36 jam**

Duncan<sup>a,b</sup>

Media	N	Subset	
		1	2
Tepung Jagung	12	,0097	
Tepung Tapioka	12	,0153	
Tepung Terigu	12		,8083
Sig.		,165	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed,

Based on observed means,

The error term is Mean Square(Error) =

9,114E-5,

a, Uses Harmonic Mean Sample Size =

12,000,

b, Alpha = ,05,

**Kepadatan Spora 36 jam**

Duncan<sup>a,b</sup>

Dosis	N	Subset		
		1	2	3
Dosis 5 g/l	9	,2389		
Dosis 20 g/l	9	,2401		
Dosis 10 g/l	9		,2561	
Dosis 15 g/l	9			,3759
Sig.		,788	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed,

Based on observed means,

The error term is Mean Square(Error) = 9,114E-5,

a, Uses Harmonic Mean Sample Size = 9,000,

b, Alpha = ,05,

## Lampiran 6. Data Hasil Statistik Menggunakan Aplikasi SPSS (Lanjutan)

Produksi spora *B. megaterium* 60 jam

## Between-Subjects Factors

	Value	Label	N
Media	1,00	Tepung Tapioka	12
	2,00	Tepung Terigu	12
	3,00	Tepung Jagung	12
Dosis	1,00	Dosis 5 g/l	9
	2,00	Dosis 10 g/l	9
	3,00	Dosis 15 g/l	9
	4,00	Dosis 20 g/l	9

## Descriptive Statistics

Dependent Variable: Kepadatan Spora

Media	Dosis	Mean	Std. Deviation	N
Tepung Tapioka	Dosis 5 g/l	,0300	,00100	3
	Dosis 10 g/l	,0290	,00000	3
	Dosis 15 g/l	,0330	,00000	3
	Dosis 20 g/l	,0303	,00058	3
	Total	,0306	,00162	12
Tepung Terigu	Dosis 5 g/l	1,0333	,05774	3
	Dosis 10 g/l	1,3000	,00000	3
	Dosis 15 g/l	1,5000	,00000	3
	Dosis 20 g/l	1,1000	,00000	3
	Total	1,2333	,19228	12
Tepung Jagung	Dosis 5 g/l	,0210	,00000	3
	Dosis 10 g/l	,0290	,00100	3
	Dosis 15 g/l	,0330	,00000	3
	Dosis 20 g/l	,0230	,00100	3
	Total	,0265	,00502	12
Total	Dosis 5 g/l	,3614	,50476	9
	Dosis 10 g/l	,4527	,63550	9
	Dosis 15 g/l	,5220	,73350	9
	Dosis 20 g/l	,3844	,53668	9
	Total	,4301	,58601	36



### Lampiran 6. Data Hasil Statistik Menggunakan Aplikasi SPSS (Lanjutan)

#### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Kepadatan Spora

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	12,013 <sup>a</sup>	11	1,092	3927,463	,000
Intercept	6,661	1	6,661	23954,568	,000
Faktor_A	11,612	2	5,806	20881,229	,000
Faktor_B	,142	3	,047	169,961	,000
Faktor_A *	,259	6	,043	154,959	,000
Faktor_B					
Error	,007	24	,000		
Total	18,680	36			
Corrected Total	12,019	35			

a. R Squared = ,999 (Adjusted R Squared = ,999)

#### Kepadatan Spora 84 jam

Duncan<sup>a,b</sup>

Media	N	Subset	
		1	2
Tepung Jagung	12	,0265	
Tepung Tapioka	12	,0306	
Tepung Terigu	12		1,2333
Sig.		,554	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed,

Based on observed means,

The error term is Mean Square(Error) = ,000,

a, Uses Harmonic Mean Sample Size =

12,000,

b, Alpha = ,05,

#### Kepadatan Spora 84 jam

Duncan<sup>a,b</sup>

Dosis	N	Subset			
		1	2	3	4
Dosis 5 g/l	9	,3614			
Dosis 20 g/l	9		,3844		
Dosis 10 g/l	9			,4527	
Dosis 15 g/l	9				,5220
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed,

Based on observed means,

The error term is Mean Square(Error) = ,000,

a, Uses Harmonic Mean Sample Size = 9,000,

b, Alpha = ,05,

Lampiran 6. Data Hasil Statistik Menggunakan Aplikasi SPSS (Lanjutan)

Between-Subjects Factors			
	Value	Label	N
Media	1,00	Tepung Tapioka	12
	2,00	Tepung Terigu	12
	3,00	Tepung Jagung	12
Dosis	1,00	Dosis 5 g/l	9
	2,00	Dosis 10 g/l	9
	3,00	Dosis 15 g/l	9
	4,00	Dosis 20 g/l	9

Descriptive Statistics				
Dependent Variable: Kepadatan Spora				
Media	Dosis	Mean	Std, Deviation	N
Tepung Tapioka	Dosis 5 g/l	,0400	,00000	3
	Dosis 10 g/l	,0400	,00000	3
	Dosis 15 g/l	,0407	,00058	3
	Dosis 20 g/l	,0347	,00058	3
	Total	,0388	,00255	12
Tepung Terigu	Dosis 5 g/l	1,0333	,05774	3
	Dosis 10 g/l	1,3333	,05774	3
	Dosis 15 g/l	1,5000	,00000	3
	Dosis 20 g/l	1,1000	,00000	3
	Total	1,2417	,19752	12
Tepung Jagung	Dosis 5 g/l	,0210	,00100	3
	Dosis 10 g/l	,0290	,00000	3
	Dosis 15 g/l	,0327	,00058	3
	Dosis 20 g/l	,0230	,00100	3
	Total	,0264	,00491	12
Total	Dosis 5 g/l	,3648	,50231	9
	Dosis 10 g/l	,4674	,65008	9
	Dosis 15 g/l	,5244	,73167	9
	Dosis 20 g/l	,3859	,53561	9
	Total	,4356	,58857	36

Lampiran 6. Data Hasil Statistik Menggunakan Aplikasi SPSS (Lanjutan)

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: Kepadatan Spora

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	12,111 <sup>a</sup>	11	1,101	1980,965	,000
Intercept	6,832	1	6,832	12292,293	,000
Faktor_A	11,695	2	5,848	10520,927	,000
Faktor_B	,148	3	,049	88,490	,000
Faktor_A *	,269	6	,045	80,548	,000
Faktor_B					
Error	,013	24	,001		
Total	18,957	36			
Corrected Total	12,125	35			

a. R Squared = ,999 (Adjusted R Squared = ,998)

**Kepadatan Spora 108 jam**

Duncan<sup>a,b</sup>

Media	N	Subset	
		1	2
Tepung Jagung	12	,0264	
Tepung Tapioka	12	,0388	
Tepung Terigu	12		1,2417
Sig.		,209	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed,

Based on observed means,

The error term is Mean Square(Error) = ,001,

a, Uses Harmonic Mean Sample Size =

12,000,

b, Alpha = ,05,

**Kepadatan Spora 108 jam**

Duncan<sup>a,b</sup>

Dosis	N	Subset		
		1	2	3
Dosis 5 g/l	9	,3648		
Dosis 20 g/l	9	,3859		
Dosis 10 g/l	9		,4674	
Dosis 15 g/l	9			,5244
Sig.		,070	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed,

Based on observed means,

The error term is Mean Square(Error) = ,001,

a, Uses Harmonic Mean Sample Size = 9,000,

b, Alpha = ,05,

Lampiran 6. Data Hasil Statistik Menggunakan Aplikasi SPSS (Lanjutan)

**Efisiensi Sporulasi *B. megaterium***

Between-Subjects Factors			
	Value	Label	N
Media	1,00	Tepung Tapioka	12
	2,00	Tepung Terigu	12
	3,00	Tepung Jagung	12
Dosis karbon	1,00	Dosis karbon 5 g/l	9
	2,00	Dosis karbon 10 g/l	9
	3,00	Dosis karbon 15 g/l	9
	4,00	Dosis karbon 20 g/l	9

**Descriptive Statistics**

Dependent Variable: Efisiensi Sporulasi

Media	Rasio C/N	Mean	Std, Deviation	N
Tepung Tapioka	Dosis karbon 5 g/l	80,9667	1,25237	3
	Dosis karbon 10 g/l	71,3867	2,32775	3
	Dosis karbon 15 g/l	49,0067	1,21698	3
	Dosis karbon 20 g/l	49,3033	1,52906	3
	Total	62,6658	14,61606	12
Tepung Terigu	Dosis karbon 5 g/l	89,5167	1,17309	3
	Dosis karbon 10 g/l	91,3000	1,13649	3
	Dosis karbon 15 g/l	86,3867	,55510	3
	Dosis karbon 20 g/l	69,1500	,41328	3
	Total	84,0883	9,22460	12
Tepung Jagung	Dosis karbon 5 g/l	47,9067	1,83288	3
	Dosis karbon 10 g/l	50,7367	,67649	3
	Dosis karbon 15 g/l	55,2467	1,27115	3
	Dosis karbon 20 g/l	33,7567	1,44338	3
	Total	46,9117	8,47173	12
Total	Dosis karbon 5 g/l	72,7967	19,07245	9
	Dosis karbon 10 g/l	71,1411	17,61634	9
	Dosis karbon 15 g/l	63,5467	17,36632	9
	Dosis karbon 20 g/l	50,7367	15,40074	9
	Total	64,5553	18,84698	36

### Lampiran 6. Data Hasil Statistik Menggunakan Aplikasi SPSS (Lanjutan)

#### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Efisiensi Sporulasi

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	12389,369 <sup>a</sup>	11	1126,306	629,549	,000
Intercept	150025,820	1	150025,820	83856,901	,000
Faktor_A	8356,887	2	4178,444	2335,540	,000
Faktor_B	2729,385	3	909,795	508,530	,000
Faktor_A *	1303,097	6	217,183	121,394	,000
Faktor_B					
Error	42,938	24	1,789		
Total	162458,127	36			
Corrected Total	12432,307	35			

a. R Squared = ,997 (Adjusted R Squared = ,995)

#### Efisiensi Sporulasi

Duncan<sup>a,b</sup>

Media	N	Subset		
		1	2	3
Tepung Jagung	12	46,9117		
Tepung Tapioka	12		62,6658	
Tepung Terigu	12			84,0883
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed ,

Based on observed means ,

The error term is Mean Square(Error) = 1,789 ,

a , Uses Harmonic Mean Sample Size = 12,000 ,

b , Alpha = ,05 ,

#### Efisiensi Sporulasi

Duncan<sup>a,b</sup>

Dosis karbon g/l	N	Subset			
		1	2	3	4
Dosis karbon 20	9	50,7367			
Dosis karbon 15	9		63,5467		
Dosis karbon 10	9			71,1411	
Dosis karbon 5	9				72,7967
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed ,

Based on observed means ,

The error term is Mean Square(Error) = 1,789 ,

a , Uses Harmonic Mean Sample Size = 9,000 ,

b , Alpha = ,05 ,