

Aktivitas Antibakteri Isolat bakteri X2 yang Berasosiasi Spons *Xestospongia testudinaria* dari Pantai Pasir Putih Situbondo terhadap Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

(Antibacterial Activity of Isolates of Bacteria X2 Associated with Sponge *Xestospongia testudinaria* from Pasir Putih Beach Situbondo Against *Pseudomonas aeruginosa*)

YATNITA PARAMA CITA¹, OCKY KARNA RADJASA², PRATIWI SUDHARMONO³

1Program Studi Doktor Ilmu Biomedik, Fakultas kedokteran Universitas Indonesia.
2Center for Tropical Coastal and Marine Studies, Diponegoro University, Semarang 50275.
3Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

Diterima 24 Desember 2015, Disetujui 17 Juni 2016

Abstract: Penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi dan menguji aktivitas antibakteri dari isolat bakteri X2 yang berasosiasi dengan spons *Xestospongia testudinaria* dari Pantai Pasir Putih Situbondo. Isolasi bakteri dilakukan dengan metoda *pour plate* kemudian koloni bakteri yang diperoleh dimurnikan dengan metode *streak plate*. Isolat bakteri X2 dihasilkan 12 isolat bakteri yang akan diuji aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Salmonella typhii* menggunakan metode *overlay*. Hasil uji mendapatkan isolat X2-10 yang aktif terhadap *P. aeruginosa* ATCC27853 dan MDR dengan menggunakan metode difusi agar. Karakterisasi isolat X2-10 dilakukan dengan uji pewarnaan Gram, uji biokimia dan identifikasi dengan 16s-rRNA. Hasil penelitian menunjukkan isolat bakteri X2-10 yang berasosiasi dengan spons *X. testudinaria* memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri *P. aeruginosae* ATCC27853 dan MDR dan hasil karakterisasi dari isolat bakteri X2-10 merupakan *B. licheniformis*.

Kata kunci: : isolat X2-10, *P. aeruginosae*, antimikroba, *B. licheniformis*.

Abstract: This study was conducted to isolate and test the antibacterial activity of bacterial isolate X2 associated with *Xestospongia testudinaria* sponge from Pasir Putih Beach Situbondo. Bacterial isolation was carried out by pour plate method then bacteria colony obtained was purified by streak plate method. Isolate bacteria X2 produced 12 bacterial isolates which was tested for antibacterial activity against test bacterias of *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhii* using overlay method. The results demonstrated that obtained isolate X2-10 was active against *P. aeruginosa* ATCC27853 and MDR using agar diffusion method. Characterization of isolate X2-10 was done by Gram staining test, biochemical test and identification with 16s-rRNA. The results showed that bacterial isolates X2-10 associated with *X. testudinaria* sponge displayed an antimicrobial activity against *P. aeruginosa* ATCC27853 and MDR. Based on the characterization result, the bacterial isolate X2-10 was *B. licheniformis*.

Keywords: isolates X2-10, *P. aeruginosae*, antimicrobial, *B. licheniformis*.

* Penulis korespondensi, Hp. 0816839098
e-mail: nitatafshiilaa@yahoo.com

PENDAHULUAN

RESISTENSI antibiotik merupakan masalah kesehatan masyarakat di seluruh dunia yang terus tumbuh. Hal ini terjadi ketika *strain* bakteri dalam tubuh manusia menjadi resisten terhadap antibiotik karena penggunaan yang kurang sesuai dan penyalahgunaan antibiotik. Resistensi bakteri patogen terhadap antibiotik-antibiotik yang ditemukan telah menjadi masalah besar bagi dunia kesehatan⁽¹⁾. Pencarian antibiotika perlu dilakukan untuk mengatasi masalah resistensi salah satunya adalah dengan eksplorasi bahan alam yang berasal dari laut antara lain spons. Penelitian yang telah dilakukan sebelumnya adalah skrining senyawa antimikroba dari beberapa ekstrak spons yang diambil dari Pantai Pasir Putih, Situ Bondo. Hasil penelitian menunjukkan ekstrak metanol *Xestospongia testudinaria* paling aktif dibandingkan ke-7 ekstrak spons yang diteliti dengan diameter hambatan (15-20 mm) terhadap *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *S. typhi*, *P. aeruginosa* MDR dan MRSA⁽²⁾.

Pemanfaatan spons yang berlebihan untuk mencari bahan bioaktif yang baru dapat mengakibatkan *overfishing* yang dapat merugikan sistem ekologi biota laut. Selain itu, pertumbuhan spons yang relatif lambat akan menyebabkan keterbatasan ketersediaan biomassa sumber metabolit sekundernya. Spons menjadi fokus yang menarik akhir-akhir ini dikarenakan dua faktor utama yaitu spons mampu membentuk asosiasi dengan berbagai mikroba dan spons merupakan sumber yang kaya bioaktif metabolit sekunder⁽³⁾. Oleh karena itu, pemanfaatan mikroorganisme yang bersimbiosis dengan spons akan lebih aman dan lebih baik karena bakteri penghasil metabolit sekunder yang bersifat bioaktif dapat dikulturkan dalam skala laboratorium dan dapat diperbanyak dalam waktu yang relatif singkat⁽⁴⁾.

Spons laut diketahui menjadi tempat hidup beberapa jenis bakteri yang jumlahnya mencapai 40 persen dari biomassa spons. Simbiosis yang terjadi antara bakteri dengan spons laut menyebabkan organisme ini sebagai invertebrata laut yang memiliki potensi antibakteri yang lebih besar dibandingkan dengan organisme darat dan laut lainnya⁽⁵⁾. Komunitas mikroba yang beragam dan berjumlah besar pada spons diduga merupakan sumber dari berbagai senyawa bioaktif tersebut. Isolasi bakteri yang bersimbiosis dengan spons, karakterisasi molekuler dan karakterisasi senyawa bioaktif yang dihasilkan bakteri tersebut merupakan strategi yang dapat digunakan dalam memproduksi berbagai senyawa yang memiliki potensi terapi antibakteri dalam jumlah besar⁽⁶⁾.

Penelitian lain yang telah dilakukan terhadap isolat bakteri yang berasosiasi dengan *X. testudinaria* yang

diambil dari Sorong, menemukan senyawa metabolit sekunder dari isolat Xp 4.2 memiliki aktivitas terhadap bakteri Gram negatif antara lain *K. pneumoniae* dan *E. coli* dengan nilai diameter hambatan >20 mm⁽⁷⁾. Aktivitas antibakteri dikatakan memiliki aktivitas kuat bila diameter hambatan >16,0 mm, aktivitas sedang dengan diameter hambatan 11-16 mm dan lemah dengan diameter hambatan <7 mm⁽⁸⁾.

Berdasarkan hasil penelitian tersebut spons senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan dari asosiasi bakteri dengan *X. testudinaria* berpotensi untuk dikembangkan. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat bakteri yang berasosiasi dengan spons *Xestospongia testudinaria* yang mempunyai aktivitas antibakteri yang dapat membunuh ataupun menghambat pertumbuhan bakteri resisten *P. aeruginosa*, serta identifikasi bakteri simbiosis yang memiliki aktivitas antimikroba tersebut.

BAHAN DAN METODE

BAHAN.

METODE. Pengambilan Sampel. Pengambilan sampel spons dilakukan di Perairan Pantai Pasir Putih, Situbondo, Jawa Timur dengan teknik *SCUBA diving*. Sampel spons diambil sebanyak ±200 g dan kemudian dimasukkan dalam kantong plastik dan disimpan dalam *icebox* agar sampel tetap segar dan tidak rusak.

Isolasi Bakteri Simbiosis. Sebanyak ±5 g sampel jaringan organisme laut diambil dari perairan dimasukkan ke dalam plastik, kemudian dimasukkan ke dalam *cool box*, dan dibawa ke laboratorium untuk diisolasi bakteri simbiosis atau asosiasinya. Sampel dibilas menggunakan air laut steril (untuk membersihkan sedimen dan kotoran yang menempel pada jaringan). Untuk mengisolasi bakteri simbiosis endofit, permukaan sampel jaringan organisme laut diusap menggunakan kain/tisu yang telah dibasahi alkohol (untuk menghilangkan bakteri-bakteri yang menempel di permukaan jaringan). Sampel jaringan organisme laut dipotong kecil-kecil dan dihaluskan.

Sebanyak 1 gram sampel dimasukkan ke dalam 9 mL air laut steril, sehingga didapatkan pengenceran 10^{-1} , sampel digojog/*divortex* hingga homogen. Sebanyak 1 mL hasil pengenceran 10^{-1} dipindahkan ke dalam 9 mL air laut steril sehingga didapatkan pengenceran 10^{-2} , sampel digojog/*divortex* hingga homogen. Dari masing-masing hasil pengenceran diambil 35 μ L kemudian ditanam ke permukaan medium agar. Hasil Isolasi diinkubasi pada suhu 35 °C selama 2x24 jam. Koloni yang tumbuh diamati berdasarkan morfologinya (bentuk, warna dan tekstur). Koloni yang tumbuh dimurnikan menggunakan metode *streak plates* hingga didapatkan koloni murni/koloni tunggal⁽⁹⁾.

Uji aktivitas antibakteri. Metode *overlay*.

Bakteri simbiosis ditanam (digoreskan melingkar) pada medium agar Zobell 2216E menggunakan metode goresan. Inkubasi selama 2x24 jam pada suhu 37 °C. Kultur cair bakteri patogen/bakteri uji dengan kepadatan 10⁹ sel/mL dicampurkan ke dalam media *soft* agar Zobell 2216E (Volume kultur cair 1% dari volume *soft* agar Zobell 2216E). Media *soft* agar Zobell 2216E yang telah diinokulasikan bakteri dituang ke permukaan media agar Zobell 2216E yang telah ditanami bakteri simbiosis. Inkubasi selama 4 hari pada ruangan. Zona Hambat yang terbentuk diamati dan dicatat⁽¹⁰⁾.

Metode difusi agar. Sebanyak 100 µL kultur cair bakteri patogen/bakteri uji dengan kepadatan 10⁹ sel/mL diinokulasikan ke media agar Zobell 2216E tawar, ratakan ke seluruh permukaan media agar menggunakan *spreader*. Diamkan selama 15 menit. *Paper disk* diletakkan dipermukaan agar yang sudah ditanami bakteri patogen bakteri uji. Kemudian 30 µL kultur cair bakteri simbiosis diteteskan pada *paper disk*. Inkubasi selama 2x24 jam pada suhu ruangan. Zona hambat yang terbentuk diamati dan diukur⁽¹⁰⁾.

Identifikasi Isolat Bakteri X2. Identifikasi secara molekuler dilakukan dengan menggunakan *Polimerase Chain Reaction* (PCR) 16S rDNA. Primer yang digunakan untuk PCR 16S rDNA adalah primer universal untuk bakteri 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') dan primer spesifik 1492R. Amplifikasi DNA dilakukan dengan pengkondisian alat pada suhu 96 °C selama 2 menit, selanjutnya sebanyak 25 siklus dengan ketentuan denaturasi pada suhu 96 °C selama 10 detik; *annealing* pada suhu 50 °C selama 5 detik; dan reaksi pemanjangan pada suhu 60 °C selama 4 menit. Penelusuran dilakukan menggunakan internet melalui program pelacakan database *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST)⁽¹¹⁾.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Koloni bakteri simbiosis yang tumbuh diamati berdasarkan bentuk, warna dan tekstur untuk mewakili semua koloni bakteri yang tumbuh karena jumlah koloni yang tumbuh tidak terlalu padat namun bervariasi. Dari koloni bakteri simbiosis X2 di dapat 12 isolat bakteri yang dapat diisolasi berdasarkan bentuk koloni dan warna serta jumlah yang representatif. Bakteri simbiosis tersebut ditumbuhkan pada agar miring dan diinkubasi selama 24 jam. Hasil pengamatan ditampilkan pada Tabel 1.

Hasil uji skrining aktivitas antibakteri isolat bakteri simbiosis X2 terhadap bakteri ditunjukkan dengan adanya zona bening disekitar cakram. Adanya zona

Tabel 1. Morfologi bakteri berdasarkan warna dan bentuk koloni.

Kode Isolat	Bentuk	Warna	Tekstur
X2-1	Tak beraturan	Orange	Cembung
X2-2	Bulat	Orange	Cembung
X2-3	Bulat	muda	Datar
X2-4	Bulat	Putih	Datar
X2-5	Bulat	Krem	Datar
X2-6	Tak beraturan	Kuning	Pinggiran kasar
X2-7	Bulat	Orange	Pinggiran bergerigi
X2-8	Bulat	Kuning	Datar
X2-9	Bulat	Putih keruh	Datar
X2-10	Tak beraturan	Orange	Cembung
X2-11	Bulat	Coklat	Cembung
X2-12	Tak beraturan	Putih Keruh	Bergerigi

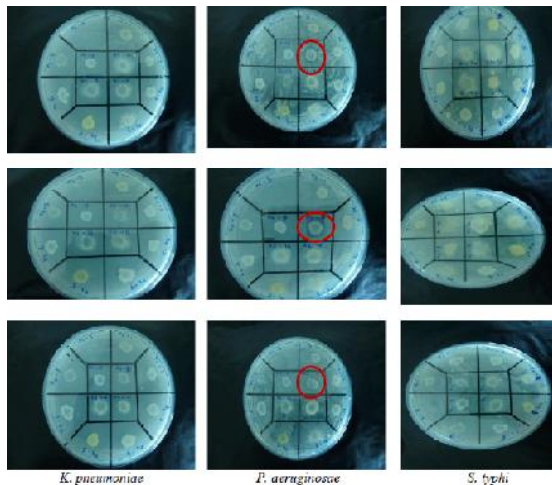
Tabel 1. Hasil skrining uji aktivitas antibakteri isolat bakteri X2 terhadap bakteri resisten.

Kode isolat	<i>P. aeruginosae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. typhi</i>
X2-1	-	-	-
X2-2	-	-	-
X2-3	-	-	-
X2-4	-	-	-
X2-5	-	-	-
X2-6	-	-	-
X2-7	-	-	-
X2-8	-	-	-
X2-9	-	-	-
X2-10	+	-	-
X2-11	-	-	-
X2-12	-	-	-

bening di sekitar cakram mengindikasikan adanya aktivitas antibakteri dari bakteri yang berasosiasi dengan spons *X. testudinaria*.

Hasil skrining uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode *overlay* yaitu pengujian menggunakan dua lapis agar. Diduga bahwa pertumbuhan bakteri MDR dihambat oleh senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh isolat bakteri simbiosis. Hasil penelitian dilihat dengan terbentuknya zona hambat di sekitar isolat bakteri simbiosis *X. testudinaria* yang membuktikan bahwa isolat-isolat bakteri simbiosis tersebut memiliki potensi menghasilkan suatu antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji.

Gambar 1 menunjukkan isolat bakteri X2-10 memiliki aktivitas terhadap *P. aeruginosa* yang ditunjukkan dengan adanya diameter hambatan dibandingkan dengan isolat bakteri lainnya dengan 3 x ulangan. Isolat bakteri X2-10 yang menunjukkan adanya zona hambatan pada uji kualitatif selanjutnya diuji secara kuantitatif untuk pengukuran diameter zona hambat yang terbentuk terhadap *P. aeruginosae* ATCC 27853 dan *P. aeruginosa* MDR (Tabel 3). Pada uji kuantitatif dengan metode difusi agar, kemampuan isolat bakteri dalam menghambat bakteri uji ditunjukkan dengan terbentuknya zona



Gambar 1. Aktivitas antibakteri isolat X2-10 terhadap 2 bakteri *P. aeruginosa*, *K. pneumonia* dan *S. thypii*.

hambat di sekitar *paper disk* (Gambar 2).

Dalam uji aktivitas antibakteri, hasil diperoleh melalui pengamatan yang dilakukan selama 1x24 jam masa inkubasi dengan 3 kali pengulangan untuk masing-masing bakteri. Terbentuknya zona hambatan (daerah bening) disekeliling cakram menunjukkan kepekaan bakteri terhadap bahan antibakteri maupun antibiotik yang digunakan sebagai positif kontrol. Hasil pengukuran diameter hambatan ditampilkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil uji antibakteri dari isolat X2-10 terhadap *P. aeruginosa* ATCC27853 dan MDR.

Isolat	Bakteri uji	Pengulangan	Zona Hambat (cm)	
			Isolat X2-10	Kloramfenikol
X2-10	<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	1	2	2,5
		2	1,99	2,22
		3	1,9	2,59
		Rata-rata	1,963±0,35	2,57±0,85
<i>P. aeruginosa</i> MDR	MDR	1	1,84	2,16
		2	2,19	2,48
		3	2,7	2,65
		Rata-rata	2,34±0,95	2,43±0,75



Gambar 2. Hasil uji antimikroba isolat X2-10 terhadap bakteri *P. aeruginosa*.

Diameter hambatan isolat X2-10 terhadap bakteri uji *P. aeruginosa* ATCC 27853 dan MDR adalah sebesar (1,963±0,35 cm) dan (2,34±0,95 cm) dan sebanding dengan kloramfenikol sebagai kontrol positif. Kloramfenikol merupakan antibiotik bakteriostatik berspektrum luas dengan mekanisme kerja akan berikatan secara reversibel dengan unit ribosom 50 S, Sehingga mencegah ikatan antara asam amino dengan ribosom.

Identifikasi Isolat Bakteri X2-10. Karakterisasi yang dilakukan terhadap isolat bakteri X2-10 meliputi : 1) Pengamatan mikroskopik berupa bentuk koloni, permukaan koloni dan warna koloni, 2) Pengamatan mikroskopik dengan pewarnaan Gram, 3) Uji reaksi biokimia dan 4) Uji molekuler 16s RNA. Hasil karakterisasi bentuk morfologi koloni bakteri dapat dilihat pada Tabel 4. Pada Tabel 4 memperlihatkan isolat bakteri berwarna krem susu, berbentuk batang, berombak dan termasuk Gram positif.

Hasil uji reaksi biokimia dari isolat bakteri X2-10 di tampilkan pada Tabel 5. Tabel 5 menunjukkan karakteristik dari isolat X2-10 terhadap uji reaksi biokimia dimana isolat bakteri X2-10 mampu memfermentasikan beberapa jenis gula antara lain: glukosa, sukrosa dan maltosa, katalase positif, VR-MR positif. Berdasarkan pengamatan secara mikroskopis dan uji reaksi biokimia isolat bakteri X2-10 mengarah ke genus *Bacillus*. Genus *Bacillus* dicirikan oleh sel yang berbentuk batang, pewarnaan Gram positif, terdapat endospora yang terletak pada bagian sentral dan uji katalase positif⁽¹²⁾. Hasil analisis urutan gen 16S-rRNA menggunakan BLAST menunjukkan isolat bakteri X2-10 memiliki kekerabatan yang lebih dekat dengan *Bacillus licheniformis strain*

Tabel 4. Bentuk morfologi isolat bakteri X2-10.

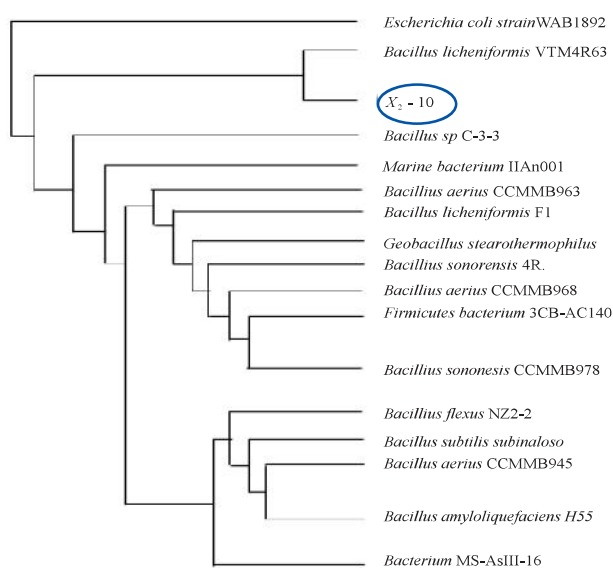
Karakter	Morfologi koloni
Warna koloni	Krem susu
Bentuk koloni	Batang
Tepi koloni	Berombak
Pewarnaan Gram	Ungu
Gram	+

Tabel 5. Karakteristik biokimia isolat bakteri X2-10.

Reaksi Biokimia	Pengamatan
1. Uji Sitrat	-
2. Uji Gelatin	+
3. Uji Motilitas	+
4. Uji VR	+
5. Uji MR	+
6. Uji Katalase	+
7. Uji Glukosa	+
8. Uji Sukrosa	+
9. Uji Maltosa	+
10. Uji Laktosa	-
11. Uji Sulfida	-

VTM4R63 (Gambar 3) dengan *similarity* 99%. Hasil tersebut mendukung dari karakteristik sebelumnya pada pewarnaan Gram dan uji reaksi biokimia yang mengarah ke genus *Bacillus*. Gen pengkode RNA ribosomal (rRNA) adalah gen yang paling lestari (*conserved*). Porsi sekuens rDNA dari tiap organisme yang secara genetik berkorelasi umumnya adalah sama. Dengan demikian setiap organisme yang memiliki jarak kekerabatan tertentu dapat disejajarkan sehingga lebih mudah untuk menentukan perbedaan dalam sekuens yang menjadi ciri khas organisme tersebut. Daerah yang lestari ini juga yang menyebabkan gen ini dapat digunakan sebagai primer universal yang digunakan dalam *Polymerase Chain Reaction* (PCR) serta dapat ditentukan urutan nukleotidnya melalui sekuensing. Gen pengkode rRNA digunakan untuk menentukan taksonomi, filogeni (hubungan evolusi) serta memperkirakan jarak keragaman antar spesies (*rates of species divergence*) bakteri⁽¹³⁾.

Penelitian yang dilakukan oleh Goma (2013) menemukan senyawa metabolit sekunder yang diisolasi dari bakteri *B. licheniformis strain* 104 memiliki aktivitas antimikroba terhadap beberapa bakteri Gram positif (*B. subtilis*, *B. cereus*, *S. aureus* dan *L. monocytogenes*) dan bakteri Gram negatif (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. typhimurium* dan *K. pneumoniae*)⁽¹⁴⁾. Bakteri yang berasal dari genus *Bacillus* menghasilkan >45 molekul antimikroba yang berspektrum luas termasuk Gram positif, Gram negatif dan fungi⁽¹⁵⁾.



Gambar 3. Pohon fitogenetik yang menunjukkan kekerabatan antara galur VTM 4R63 dengan genus *Bacillus* lainnya menggunakan data base dari GenBank yang didasarkan urutan gen pada daerah 16S rRNA.

SIMPULAN

Isolat bakteri X2-10 yang berasosiasi dengan spons *X. testudinaria* memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri resisten *P. aeruginosa* dan hasil identifikasi dan karakterisasi dari isolat bakteri X2-10 merupakan *B. licheniformis*.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Handung Nuryadi, M.Si dan Ovi Christianawati, M.Si dari UPT Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro, Semarang yang banyak membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. WHO. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. 2014.
2. Cita PC, Muzaki FK, Radjasa OK dan Sudharmono P. Screening of antimicrobial activity of extract of sponges from Pasir Putih East Java (Indonesia). Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research (In Press).
3. Taylor MW, Radax R, Steger D and Wagner M. Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. Microbiol Mol Biol Rev. 2007.71(2):295–347.
4. Abubakar H, A.T. Wahyudi and M. Yuhana. Skrining bakteri yang berasosiasi dengan spons Jaspis sp. sebagai penghasil senyawa antimikroba. Ilmu Kelautan. 2011.16:35-40.
5. Kanagasabapathy S, Samuthirapandian R, Kumaresan M, Preliminary studies for a new antibiotic from the marine mollusk Melo melo. Asian Pac. J. Trop. Med. 2005.4:310-4.
6. Proksch P, R. A. Edrada and R. Ebel. Drugs from the seas-current status and microbiological implications. Appl. Microbiol. Biot. 2002.59:125-34.
7. Cita PC, Suhermanto A, Radjasa OK and Sudharmono P. Antibacterial activity of marine bacteria isolated from sponge Xestospongia testudinaria from Sorong, Papua Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine (In Press).
8. Davis W.W, Stout T.R. Disc plate method of microbiological assay. Journal of microbiology. 1971.22(4):659-65.
9. Radjasa O. K, S. I. O. Salasia, A. Sabdono, J. Weise, J. F. Imhoff, C. Lämmler, and M. J. Risk. Antibacterial activity of marine bacterium Pseudomonas sp. Associated with Soft Coral Sinularia polydactyla against Streptococcus

- equi subsp. Zooepidemicus. *Int. J. Pharmacol.* 2007.3(2):170-4.
10. Radjasa O. K, A. Sabdono, Junaidi and E. Zocchi. Richness of secondary metabolite-producing marine bacteria associated with Sponge *Haliclona* sp.. *Int. J. Pharmacol.* 2007.3(3):275-9.
 11. Radjasa O. K, T. Martens, H. P. Grossart, T. Brinkoff, A. Sabdono, and M. Simon. Antagonistic activity of a marine bacterium *Pseudoalteromonas luteoviolacea* TAB 4.2 associated with coral *Acropora* sp. *J. Biol. Sci.* 2007.7(2):239-46.
 12. Holt J.G, Krieg N.R, Sneath H.A, Staley J.T. & Wiliam, S.T. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology* 9th ed. Baltimor: William & Wilkins.
 13. Magray MSUD, Kumar A, Rawat AK, Srivastava S. Identification of *Escherichia coli* through analysis of 16S rRNA and 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region sequences. *Bioinformation.* 2011.6(10):370-1.
 14. Gomaa EZ. Antimicrobial activity of a biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* strain M104 grown on whey. *Brazilian Archives of Biology and Technology.* 2013.56(2):259-68.
 15. Cosentino S, Mulargia AF, Pisano B, Tuveri P, Palmas F. Incidence and biochemical characteristics of *Bacillus* flora in Sardinian dairy products. *International Journal of Food Microbiology.* 1997.38:235-8.