

## Lampiran 01

Ciri-ciri morfologi koloni isolat *Bacillus* pada medium nutrisi agar umur 24 jam.

No.	Kode Isolat	Morfologi Koloni
1.	N-A1	Warna koloni kuning muda, bentuk tidak teratur, tepi berombak, permukaan transparan, licin, d. 5 mm
2.	N-A2	Warna koloni kuning muda, bentuk tidak teratur, tepi berombak, permukaan licin, buram, d. 6 mm
3.	N-A3	Warna koloni kuning muda, bentuk tidak teratur, tepi berombak halus, permukaan transparan, kelihatan seperti berair, d. 4,5 mm
4.	N-A4	Warna koloni kuning, bentuk tidak teratur, tepi berombak, permukaan licin mengkilat d. 5 mm
5.	N-A5	warna koloni putih krem, bentuk teratur, bundar, tepi rata, permukaan buram, d. 3 mm
6.	N-A6	warna koloni kuning, bentuk teratur, tepi berombak halus, permukaan licin, mengkilat,, d. 6 mm
7.	N-A7	warna koloni kuning muda, bentuk tidak teratur, tepi berombak halus, permukaan transparan, kelihatan seperti berair, lunak d. 3 mm
8.	N-B1	warna koloni putih kekuningan, bentuk teratur, tepi berombak halus, permukaan buram, menebal. d. 5 mm
9.	N-B2	warna koloni putih krem, bentuk tidak teratur, tepi rhizoid, permukaan buram, lunak, d. 7 mm
10.	N-B3	warna koloni putih krem bentuk teratur, bundar, tepi rata, permukaan buram d. 5,5 mm

No.	Kode Isolat	Morfologi Koloni
11.	N-B4	warna koloni kuning muda, bentuk tidak teratur, tepi berombak halus, permukaan kasar (seperti bergranula), melekat kuat pada agar, d. 4 mm
12.	N-B5	warna koloni kuning, bentuk teratur, tepi berombak, permukaan buram, menebal, melekat kuat pada agar d. 5 mm
13.	N-B6	warna putih kekuningan, bentuk teratur, tepi berombak halus, permukaan licin, mengkilat, sedikit berair, d. 4,5 mm
14.	N-C1	warna koloni petih kekuningan, bentuk rhizoid, tidak teratur, permukaan buram d. 6 mm
15.	N-C2	warna koloni putih krem, bentuk tidak teratur, tepi terbelah-belah, permukaan seperti bergranula, kasar, d. 4,5 mm
16.	N-C3	warna koloni kuning muda, bentuk tidak teratur, tepi berombak, permukaan kasar (seperti ada titik-titik halus), d. 4 mm
17.	N-C4	warna koloni putih, bentuk tidak teratur, tepi rata, permukaan sedikit buram, agak transparan, d. 6 mm
18.	N-C5	warna koloni kuning muda, bentuk teratur, tepi berombak, permukaan kasar, seperti bergranula halus, d. 7 mm
19.	N-C6	warna koloni putih kekuningan, bentuk amoeboid, tipe rata, permukaan transparan, d. 5 mm
20.	N-C7	warna koloni kuning muda, bentuk tidak teratur, tepi berombak halus, permukaan buram, menebal, d. 4 mm
21.	N-C8	warna koloni kuning muda, bentuk teratur, tepi rata permukaan licin, seperti berair, lunak, d. 5 mm
22.	N-C9	warna koloni kuning muda, bentuk tidak teratur, tepi berombak, permukaan buram, menebal, seperti berair, d. mm

Sumber : Data primer oleh Noorlanyati  
 Keterangan : d. : diameter koloni

## Lampiran 02.

Hasil pengamatan morfologi sel, spora, katalase dan motilitas isolat *Bacillus*.

No.	Kode Isolat	P e n g a m a t a n						
		1	2	3	4	5	6	7
1.	N-A1	batang	+	-	+	+	oval	Sentral
2.	N-A2	batang	+	-	+	+	oval	Sentral
3.	N-A3	batang	+	-	+	+	oval	Sentral
4.	N-A4	batang	+	-	+	+	oval	Sentral
5.	N-A5	batang	+	-	+	+	bulat	Sentral
6.	N-A6	batang	+	-	+	+	oval	subterminal
7.	N-A7	batang	+	-	+	+	bulat	Sentral
8.	N-B1	batang	+	-	+	+	oval	terminal
9.	N-B2	batang	+	-	+	+	oval	subterminal
10.	N-B3	batang	+	-	+	+	bulat	subterminal
11.	N-B4	batang	+	-	+	+	bulat	subterminal
12.	N-B5	batang	+	-	+	+	bulat	Sentral
13.	N-B6	batang	+	-	+	+	oval	Sentral
14.	N-C1	batang	+	-	+	+	oval	subterminal
15.	N-C2	batang	+	-	+	+	oval	subterminal
16.	N-C3	batang	+	-	+	+	oval	subterminal
17.	N-C4	batang	+	-	+	+	oval	terminal
18.	N-C5	batang	+	-	+	+	bulat	Sentral
19.	N-C6	batang	+	-	+	+	oval	subterminal
20.	N-C7	batang	+	-	+	+	oval	terminal
21.	N-C8	batang	+	-	+	+	oval	Sentral
22.	N-C9	batang	+	-	+	+	oval	Sentral

Sumber : Data primer oleh Noorlanyati, 1994

## Keterangan :

- 1 : bentuk sel
- 2 : pewarnaan gram
- 3 : pewarnaan acid fast
- 4 : pengamatan motilitas
- 5 : pengujian katalase
- 6 : pengamatan bentuk spora
- 7 : pengamatan letak spora

## Lampiran 03

Data kemampuan proteolitik isolat *Bacillus* sp pada medium skim milk agar pada pH 7,2 dengan temperatur inkubasi 37°C selama 36 jam.

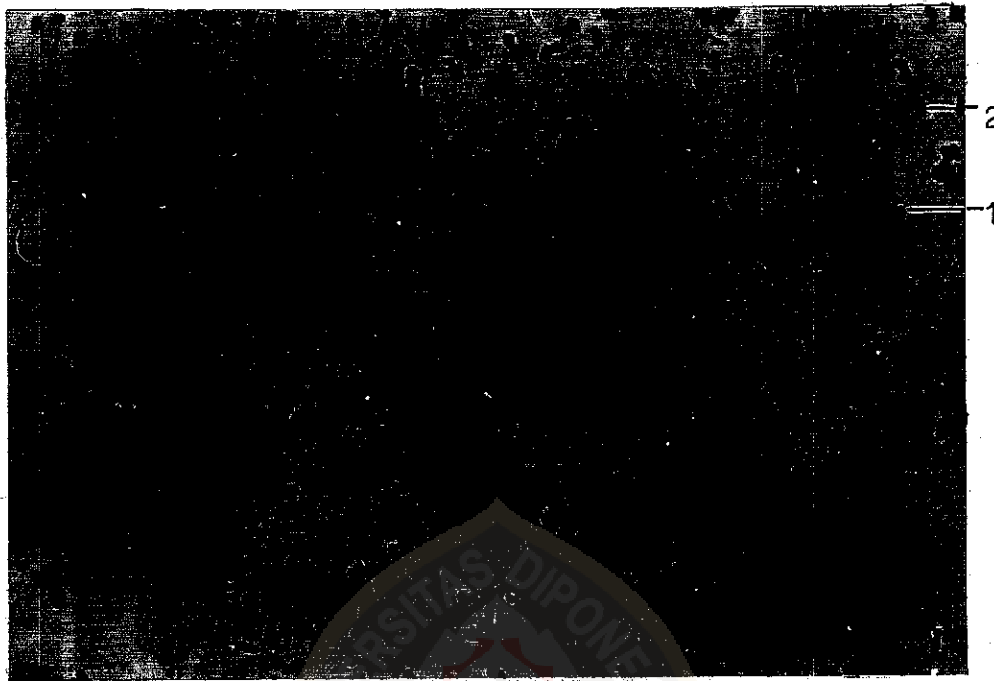
Kode isolat	diameter koloni (mm)	diameter daerah bening (zone) proteolitik (mm)	Rasio aktifitas proteolitik	rata-rata
N-A1	2,0	4,5	2,25	2,41
	2,0	5,0	2,50	
	3,0	7,0	2,33	
	3,5	9,0	2,57	
N-A2	1,5	2,5	1,67	1,50
	1,5	2,5	1,67	
	2,0	3,5	1,75	
	2,0	3,0	1,50	
	2,5	3,0	1,20	
	2,5	3,0	1,20	
N-A7	2,0	4,5	2,25	2,31
	2,0	5,0	2,50	
	3,0	5,0	2,50	
	2,5	5,0	2,00	
N-B1	2,0	3,0	1,50	1,49
	2,5	3,5	1,40	
	2,5	3,5	1,40	
	2,5	4,5	1,80	
	2,5	3,5	1,40	
	3,0	4,0	1,33	
N-B2	2,0	2,5	1,25	1,45
	2,0	3,0	1,50	
	2,5	4,0	1,60	
N-B3	1,0	2,0	2,00	1,50
	1,5	2,5	1,67	
	2,5	3,0	1,20	
	3,5	5,0	1,43	
N-B5	2,0	3,5	1,50	1,48
	2,5	4,0	1,60	
	2,5	3,0	1,40	
	3,5	5,0	1,43	
N-B6	1,5	3,5	2,33	2,25
	2,0	4,0	2,00	
	2,0	4,5	2,25	
	2,5	6,0	2,40	

Kode isolat	diameter koloni (mm)	diameter daerah bening (zone) proteolitik (mm)	Rasio aktifitas proteolitik	rata-rata
N-C3	3,0	8,5	2,83	2,53
	3,5	9,0	2,57	
	4,5	11,0	2,44	
	5,0	11,5	2,30	
N-C4	1,5	2,0	1,33	1,46
	1,5	2,0	1,33	
	1,5	2,5	1,67	
	2,0	3,0	1,50	
N-C5	3,0	4,0	1,33	1,30
	3,5	4,5	1,28	
	5,0	6,5	1,30	
N-C7	2,0	3,0	1,50	1,43
	2,5	3,5	1,40	
	3,5	4,5	1,38	
	3,5	5,0	1,43	
N-C9	2,5	6,5	2,60	2,64
	3,0	8,5	2,83	
	3,5	9,5	2,70	
	4,5	11,0	2,44	
B.S	2,5	8,0	3,20	2,77
	2,5	8,5	3,40	
	3,5	9,0	2,57	
	4,0	9,0	2,25	
	4,5	10,0	2,25	

sumber : Data Priner Noorlanyati, 1994

Lampiran 04  
Beberapa Morfologi Sel isolat *Bacillus sp*

Gambar 04. Morfologi Sel isolat N-A1 Perbesaran 1000X  
pada Pengecatan Gram Umur 24 jam



- Keterangan :
1. Sel bakteri
  2. Endospora



Gambar 05. Morfologi Sel isolat N-A7 Perbesaran 1000X  
pada Pengecatan Gram Umur 24 jam



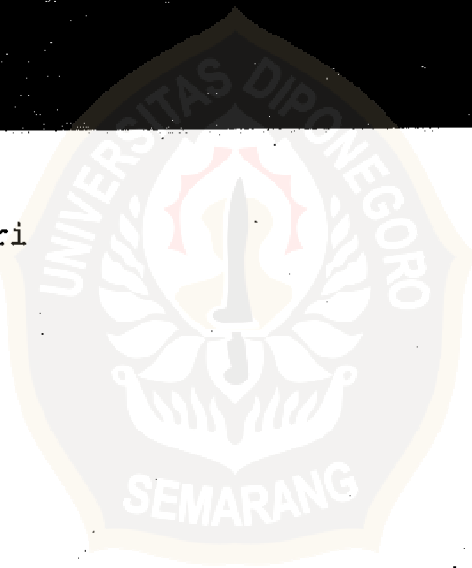
- Keterangan :
1. Sel bakteri
  2. Endospora



Gambar 06. Morfologi Sel isolat N-B6 Perbesaran 1000X pada Pengecatan Gram Umur 24 jam



- Keterangan :
1. Sel bakteri
  2. Endospora

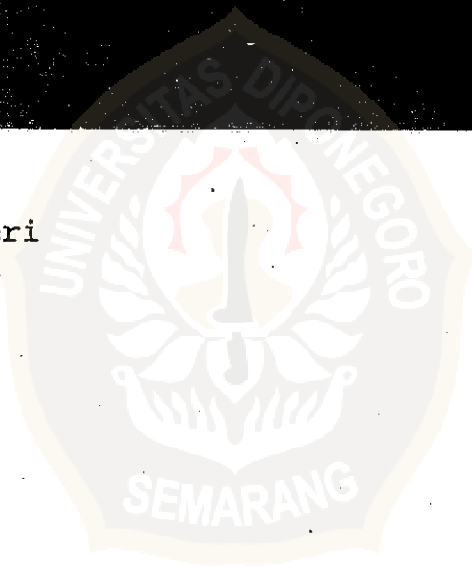




Gambar 07. Morfologi Sel isolat N-C3 Perbesaran 1000X pada Pengecatan Gram Umur 24 jam



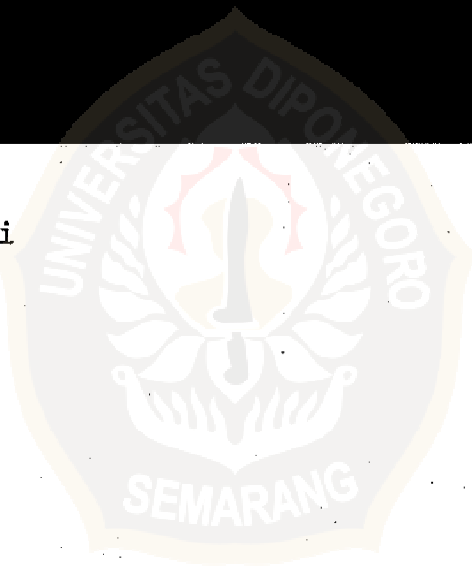
- Keterangan :
1. Sel bakteri
  2. Endospora



Gambar 08. Morfologi Sel isolat N-C9 Perbesaran 1000X  
pada Pengecatan Gram Umur 24 jam

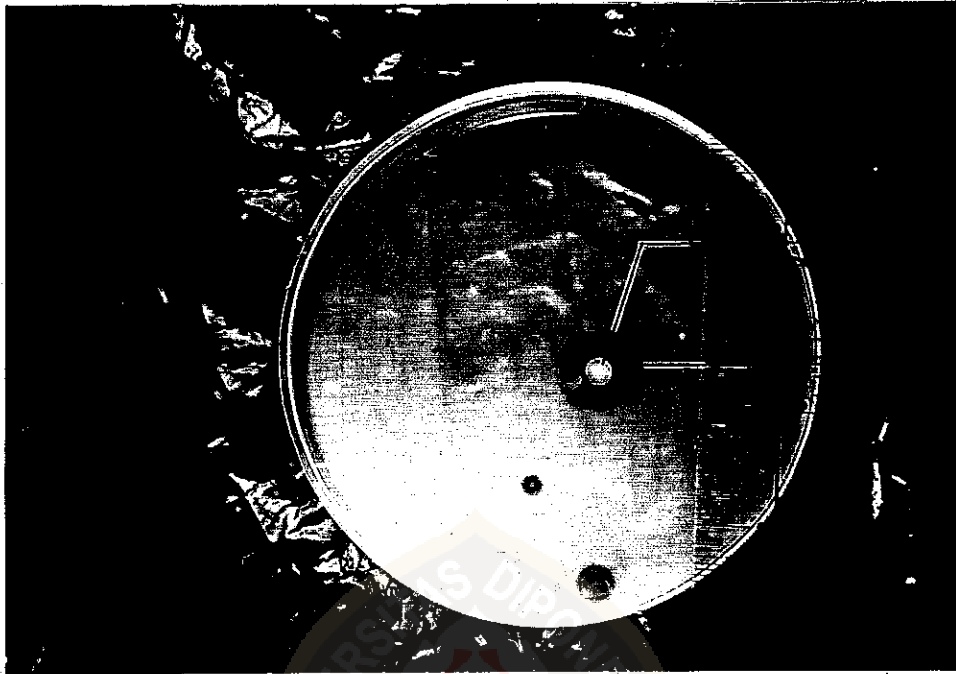


- Keterangan :
1. Sel bakteri
  2. Endospora



## Lampiran 05

Gambar 09. Hidrolisis Kasein pada Medium Skin Milk  
Agar Umur 36 jam.



Keterangan :

1. Koloni
2. Daerah bening hasil hidrolisis protein

## Lampiran 06

Tabel 08. Karakteristik untuk menentukan bakteri *Bacillus* sp menurut Cowan (1974)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Gram reaction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J
Motility <sup>a</sup>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Morphological group (see text)	1	1	1	1	1	1	1	1/2	2/3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3
Spore shape	X	X	X	X	X	X	X	X	XY	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Y
Spore position	U	U	U	U	U	U	U	UVT	T	UVT	UVT	UVT	U	T	UVT	T	T	T	1
Swelling of bacillary body	-	-	-	-	-	-	-	d	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+
Growth at 45 °C	-	d	d	+	d	+	+	+	+	d	d	d	d	d	-	+	+	+	d
Growth at 65 °C	-	-	-	-	-	-	-	d <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-	+	w	+	-
Growth at pH 5.7	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	d	d	-	+	+	.	.	-	d
Growth in 7% NaCl	+	d	+	+	+	+	+	-	+	-	-	d	-	-	-	-	.	.	d
Utilization of citrate	d	+	-	+	+	+	+	d	-	-	d	-	-	-	-	.	.	-	d
Anaerobic growth in glucose broth	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	d	+	+	+	-	-	+	-
Carbohydrates, acid from:																			
glucose	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	-
arabinose	-	-	d	+	d	+	+	d	-	-	d	+	-	+	+	d	-	-	-
mannitol	-	-	+	+	d	+	+	d	-	-	d	+	+	+	+	d	+	-	-
xylose	-	-	d	+	d	+	+	d	-	-	-	+	-	+	+	d	+	-	-
VP test	+	+	-	+	-	+	+	d	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Starch hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrate reduction	+	+	+	+	d	-	+	d	d	-	d	d	+	+	+	+	+	d	-
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	d	-	-	-	-	-	-
Gelatin hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	d	-	d	+
Casein hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	d	d	+	+	+	+	+	+	-	-	d	d
Urease	-	d	-	d	d	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	d
LY	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	.	.	d	d
Lysozyme sensitivity	r	r	s	d	s	d	d	s	s	r	d	d	r	s	d	.	.	s	d

- 1 *Bacillus anthracis*  
 2 *Bacillus cereus*; *B. anthracoides*  
 3 *Bacillus brevis*  
 4 *Bacillus licheniformis*  
 5 *Bacillus megaterium*  
 6 *Bacillus pumilus*  
 7 *Bacillus subtilis*

- 8 *Bacillus coagulans*  
 9 *Bacillus pantotheiticus*  
 10 *Bacillus alvei*  
 11 *Bacillus brevis*  
 12 *Bacillus circulans*  
 13 *Bacillus laterosporus*  
 14 *Bacillus nuceans*

- 15 *Bacillus polymyxa*  
 16 *Bacillus* sp. Wolf & Barker group I  
 17 *Bacillus* sp. Wolf & Barker group II  
 18 *Bacillus stearothermophilus*; Wolf & Barker group III  
 19 *Bacillus sphaericus*

- <sup>a</sup> All species may produce non-motile variants.  
<sup>b</sup> Some strains grow at 65 °C at pH 6.2 (Wolf & Barker).  
<sup>c</sup> Negative in 3% NaCl.  
<sup>d</sup> Positive in 3%; unknown 7%.  
<sup>e</sup> Positive in 5%; unknown 7%.

- <sup>f</sup> Gas may be produced on suitable medium.  
<sup>g</sup> Often negative in strains that have survived severe heating.  
<sup>h</sup> Under anaerobic conditions reduced to nitrogen gas.  
 J positive in young cultures; inconstant in older cultures.

- r resistant;  
 s sensitive.  
 T terminal spore.  
 U central spore.  
 V subterminal spore.  
 X spore oval.  
 Y spore round.

Other symbols used in the table are explained in Tables 5.1 and 5.2 (facing p. 43).

## Lampiran 07

Komposisi medium dan cara pembuatannya.

## 1. Medium umum pertumbuhan bakteri :

a. **Medium Nutrien Agar**, terdiri dari pepton 5 gram, ekstrak yeast 3 gram, agar 15 gram, akuades 1000 ml. Cara pembuatan : Semua bahan dicampur menjadi satu dimasukkan dalam erlenmeyer, kemudian dipanaskan sambil diaduk, kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 C selama 15 menit. Untuk membuat nutrien agar miring sebelum disterilkan pada autoklaf, terlebih dulu dimasukkan dalam tabung-tabung reaksi kira-kira 8 ml. Setelah disterilisasi, segera diambil autoklaf, kemudian diletakkan miring dan dibiarkan hingga memadat.

b. **Medium Medium Broth**, terdiri dari pepton 5 gram, ekstrak yeast 3 gram, akuades 1000 ml. Cara pembuatan : Semua bahan dicampur, dimasukkan dalam erlenmeyer dan dipanaskan sambil diaduk, kemudian disterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit. Sebelum disterilkan, terlebih dahulu dimasukkan dalam tabung-tabung reaksi kira-kira sebanyak 5 ml.

## 2. Medium untuk pengujian hidrolisis protein :

a. **medium Skim Milk Agar**, terdiri dari :

Medium A, yaitu susu skim 300 gram, akuades 1000 ml. Cara pembuatannya, semua bahan dicampur, kemudian dipanaskan dan disterilkan pada suhu 107°C selama 10 menit.

Medium B, yaitu pepton 1 gram, agar 1 gram, akuades

1000 ml, Cara membuatnya semua bahan dicampur, dipanaskan kemudian disterilkan pada suhu 121 C selama 15 menit. Untuk membuat agar dalam cawan petri. terlebih dahulu dituangkan dalam ml medium A, kemudian dituangkan medium B kira-kira sebanyak 12 ml, lalu petri digoyangkan hati-hati agar kedua medium tercampur rata.

- b. **Medium nitrien gelatin**, terdiri dari ekstrak yeast 3 gram, pepton 5 gram, gelatin 120 gram, akuades 1000 ml. Cara membuatnya, semua bahan dicampur, kemudian dipanaskan sambil diaduk, lalu dimasukkan dalam tabung-tabung reaksi, setelah itu disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C.
- c. **Medium Trypton Broth**, terdiri dari tripton 10 gram, akuades 1000 ml. Cara membuatnya, semua bahan dicampur, dipanaskan kemudian dimasukkan dalam tabung-tabung reaksi, lalu disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 C selama 15 menit.
- d. **Medium Triple Sugar Iron Agar**, terdiri dari ekstrak daging 3 gram, ekstrak yeast 3 gram, pepton 20 gram, glukosa 1, laktosa 10 gram, sukrosa 10 gram,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,2 gram, NaCl 5 gram,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,3 gram, agar 20 gram, akuades 1000ml, merah fenol 0,2% 12 ml. Cara membuatnya semua bahan dicampur, dipanaskan kemudian dimasukkan kedalam tabung-tabung reaksi, lalu disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C.

3. Medium hidrolisis amilum :

Medium Starch Agar, terdiri dari pepton 5 gram, ekstrak yeast 3 gram, amilum 3 gram, akuades 1000 ml. Cara membuatnya semua bahan dicampur, dipanaskan, kemudian disterilkan pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit.

4. Medium untuk fermentasi karbohidrat :

Medium Suchrosa Broth, terdiri dari ekstrak daging 3 gram,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  5 gram, sukrosa 5 gram, akuades 1000 gram. Cara membuatnya, semua bahan dicampur, dipanaskan, kemudian dimasukkan dalam tabung-tabung reaksi, lalu disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$ . Untuk medium Glucosa Broth, Laktosa Broth dan Arabinosa Broth, komposisi mediumnya sama seperti medium diatas, tetapi sukrosa diganti dengan glukosa, laktosa dan arabinosa.

5. Medium untuk pengujian merah metil dan voges proskauer:

Medium Methyl Red Broth, terdiri dari protoase pepton 5 gram,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  = 5 gram, glukosa 5 gram, akuades 1000 ml. Cara membuatnya, semua bahan dicampur, dipanaskan kemudian dimasukkan kedalam tabung-tabung reaksi, kira-kira sebanyak 5 ml, lalu disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$ .

6. Medium pengujian reduksi nitrat :

Medium Nitrat Broth, terdiri dari pepton 5 gram, potasium nitrat ( $\text{KNO}_3$ ) 5 gram, ekstrak daging 3 gram. Cara membuatnya, semua bahan dicampur, dipanaskan, kemudian dimasukkan kedalam tabung-tabung reaksi lalu

disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C.

7. Medium untuk pengujian penggunaan sitrat :

Medium Simon Sitrat Agar, terdiri dari NaCl 5 gram,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  = 0,2 gram, amonium sulfat ( $NH_4H_2PO_4$ ) 1 gram, kalium pospat ( $K_2HPO_4$ ) 1 gram, natrum sitrat 2 gram, agar 20 gram, akuades 1000 gram, BTB 0,08 gram. Cara membuatnya, semua bahan dicampur, dipanaskan, dimasukkan kedalam tabung-tabung reaksi, kira-kira sebanyak 8 ml lalu disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Setelah disterilisasi, segera diletakkan miring dibiarkan memadat.





## Lampiran 08

## Zat warna, indikator dan reagen

## 1. Zat warna untuk pengecatan gram:

- Larutan A : Kristal violet = 2 gram, etanol = 20 ml
- Larutan B : Amonium oksalat = 8 gram, akuades = 80 ml.

Cara membuatnya, larutan A dan larutan B dicampur.

Gram B : terdiri dari yodium = 5 gram, kalium yodium = 10 gram, akuades 1000 ml. Cara membuatnya, semua bahan dicampur.

Gram C : terdiri dari etanol 5 = 95 ml, akuades = 5 ml. Cara membuatnya semua bahan dicampur.

Gram D : terdiri dari safranin = 2,5 gram, etanol 95% = 10 ml, akuades = 100ml. Cara membuatnya safranin dilarutkan dulu dalam etanol 95% baru kemudian ditambahkan akuades.

## 2. Zat warna untuk pengecatan spora:

Klein A, terdiri dari basic fuchsin = 10 gram, etanol = 95% = 100 ml. Cara membuatnya, kedua bahan dicampur.

Klein B, terdiri dari etanol 100% = 95 ml, akuades = 5 ml, Cara membuatnya kedua bahan dicampur.

Klein C, terdiri dari hijau malasit = 5 gram, akuades = 100 ml. Cara membuatnya, kedua bahan dicampur.

3. HgCl<sub>2</sub> 12,5% dalam HCl : = 15 gram, HCl = 20 gram, akuades = 100 ml. Cara membuatnya HgCl<sub>2</sub> dicampur dengan HCl, kemudian ditambahkan HCl.

4. Indikator merah metil terdiri dari merah metil = 0,04 gram, etanol = 40 ml, akuades = 100 ml. Cara membuatnya merah metil dicampurkan dalam etanol = 40 ml, akuades = 100 ml. Cara membuatnya merah metil dilarutkan dalam etanol, kemudian ditambahkan akuades.
5. Reagen Kovac's terdiri dari p- dimetilaminobenzaldehid = 5 gram, amikl alkohol 75 ml, HCl = 25 ml. Reagen dapat diperoleh dalam bentuk siap pakai.
6. Reagen untuk pengujian Voges Proskauer terdiri dari  $\alpha$ -naftol = 6 gram, etanol 95% = 100 ml. Cara membuatnya kedua bahan dicampur. KOH 40%, cara membuatnya, KOH = 40 gram dilarutkan dalam 100 ml akuades.
7. Reagen untuk reduksi nitrit, terdiri dari:
  - Larutan A, asam sulfanilat = 8 gram, 5 N asam asetat (1 bagian asam asetat glasial dalam 2,5 bagian air) = 1000 ml. Cara membuatnya semua bahan dicampur.
  - Larutan B, dimetil anftilamin = 5 gram, 5 N asam asetat = 1000 ml. Cara membuatnya kedua bahan dicampur.
8. Pengecatan Acid Fast, terdiri dari :
  - a. ZN A, yaitu : Basic fuchsin 0,3 gr, alkohol (95%) 10 ml, fenol kristal 5 gram, akuades 95 gram.
  - b. ZN B, yaitu : HCl (37%) 3 ml, alkohol 95% 100ml
  - c. ZN C yaitu :
    - larutan A (biru metilin 0,3 gr; alkohol 95% 30ml)
    - larutan B (KOH 0,01% 100 ml). Larutan A dan B dicampur hingga homogen.