

Lampiran 01 : Ciri-ciri Morfologi Koloni Dari 28 Isolat Bakteri Berasal Dari Tanah Yang Diisolasi Di Tempat Pembuangan Tapioka.

No.	Kode isolat	Lokasi pengambilan	ciri morfologi koloni
1.	sp A1	Lokasi A	Tumbuh di atas medium, bentuk bundar permukaan berkerut, opaque, putih, d. 6 mm.
2.	sp A2	Lokasi A	Tumbuh di atas medium, bundar, mengkilat, kuning, d. 5mm.
3.	sp A3	Lokasi A	Tumbuh di atas medium, irreguler, berkerut, opaque, putih, d.13 mm.
4.	sp A4	Lokasi A	Tumbuh di atas medium, irreguler, mengkilat, translucent, d. 6 mm.
5.	sp A5	Lokasi A	Tumbuh di atas medium, bundar, mengkilat, tepi rata, opaque, d.7mm.
6.	sp A6	Lokasi A	Tumbuh di atas medium, konsentris, mengkilat, translucent, d. 5 mm.
7.	sp A7	Lokasi A	Tumbuh di atas medium, bundar, tebal, mengkilat, opaque, krem, d. 5 mm
8.	sp A8	Lokasi A	Tumbuh di atas medium, bundar, mengkilat, spt tetesan, opaque, d.4 mm
9.	sp A9	Lokasi A	Tumbuh di atas medium, irreguler suram, tepi tidak rata, d.20 mm
10.	sp B1	Lokasi B	Tumbuh di atas medium, bundar, perm.kasar, konsentris, d. 8 mm
11.	sp B2	Lokasi B	Tumbuh di atas medium, bundar, mengkilat, putih, d. 8 mm
12.	sp B3	Lokasi B	Tumbuh di atas medium, bundar, mengkilat, konsentris, kuning tua d. 10 mm
13.	sp B4	Lokasi B	Tumbuh di atas medium, rhizoid, mengkilat, melekat kuat pada agar putih, d. 20 mm.
14.	sp B5	Lokasi B	Tumbuh di atas medium, seperti benang, kasar, mengkilat, d. 30 mm

15.	sp B6	Lokasi B	Tumbuh di atas medium, amoeboid, mengkilap, putih, d.40 mm
16.	sp C1	Lokasi C	Tumbuh di atas medium, bundar, kasar ( spt ada titik-titik ), mengkilap, d.7 mm
17.	sp C2	Lokasi C	Tumbuh di atas medium, bundar, mengkilat,opaque,krem, d.4 mm
18.	sp C3	Lokasi C	Tumbuh di atas medium,irreguler, konsentris, translucent, d.20mm
19.	sp C4	Lokasi C	Tumbuh diatas medium, bulat,mengkilap,tepi tidak rata, putih,d.7mm
20.	sp C5	Lokasi C	Tumbuh di atas medium, bulat,mengkilap, tepi tidak rata,krem,d.5mm.
21.	sp C6	Lokasi C	Tumbuh di atas medium, rhizoid, mengkilap, putih, d.5 mm
22.	sp C7	Lokasi C	Tumbuh diatas medium, bundar,mengkilap,opaque, d. 10 mm
23.	sp C8	Lokasi C	Tumbuh di atas medium, bundar, kuning pucat, d.8mm
24.	sp C9	Lokasi C	Tumbuh di atas medium,bundar, mengkilap, opaque, putih, d,8mm
25.	sp C10	Lokasi C	Tumbuh di atas medium, irreguler, berkerut, kuning pucat, d.8mm,
26.	sp C11	Lokasi C	Tumbuh di atas medium, keriput, putih, d. 10 mm
27.	sp C12	Lokasi C	Tumbuh di atas medium, konsentris mengkilat,cembung, opaque, d.5mm
28.	sp C13	Lokasi C	Tumbuh di atas medium,bulat mengkilap, translucent, d.3mm.

Sumber : data primer oleh Siti Nur Jannah, 1994

## Lampiran 02.: Ciri- ciri Untuk Menentukan Genus Bacillus.

NO.	Kode isolat	Bentuk	Gram	Acid fast	Letak&Bentuk endospora	moti- litas	kata- lase
1.	Sp A1	Batang	+	-	Central, oval	+	+
2.	Sp A2	Batang	+	-	Central, oval	+	+
3.	Sp A3	Batang	+	-	Sub terminal, oval.	+	+
4.	Sp A4	Batang	+	-	Central, oval	+	+
5.	Sp A5	Batang	+	-	Central, bulat	+	+
6.	Sp A6	Batang	+	-	Central, oval	+	+
7.	Sp A7	Batang	+	-	Central, oval	+	+
8.	Sp A8	Batang	variabel	-	Sub terminal, oval	+	+
9.	Sp A9	Batang	+	-	Central, oval	+	+
10.	Sp B1	Batang	+	-	Central, oval	+	+
11.	Sp B2	Batang	variabel	-	Central, bulat	+	+
12.	Sp B3	Batang	+	-	Central, bulat	+	+
13.	Sp B4	Batang	+	-	Central, oval	+	+
14.	Sp B5	Batang	+	-	Central, oval	+	+
15.	Sp B6	Batang	+	-	Central, oval	+	+
16.	Sp C1	Batang	+	-	Central, oval	+	+
17.	Sp C2	Batang	+	-	Central, oval	+	+
18.	Sp C3	Batang	+	-	Central, oval	+	+
19.	Sp C4	Batang	+	-	Central, oval	+	+
20.	Sp C5	Batang	+	-	Central, oval	+	+
21.	Sp C6	Batang	+	-	Central, oval	+	+
22.	Sp C7	Batang	+	-	Central, oval	+	+
23.	Sp C8	Batang	+	-	Sub terminal, bulat	+	+
24.	Sp C9	Batang	+	-	Sub terminal, oval	+	+
25.	Sp C10	Batang	+	-	Central, bulat	+	+
26.	Sp C11	Batang	+	-	Sub terminal oval(swollen)	+	+
27.	Sp C12	Batang	+	-	Central, oval	+	+
28.	Sp C13	Batang	+	-	Central, oval	+	+

Sumber : data primer oleh Siti nur jannah, 1994.

Lampiran 03. Aktivitas Amilolitik Bakteri Pada Medium Uji Hidrolisis Pati.

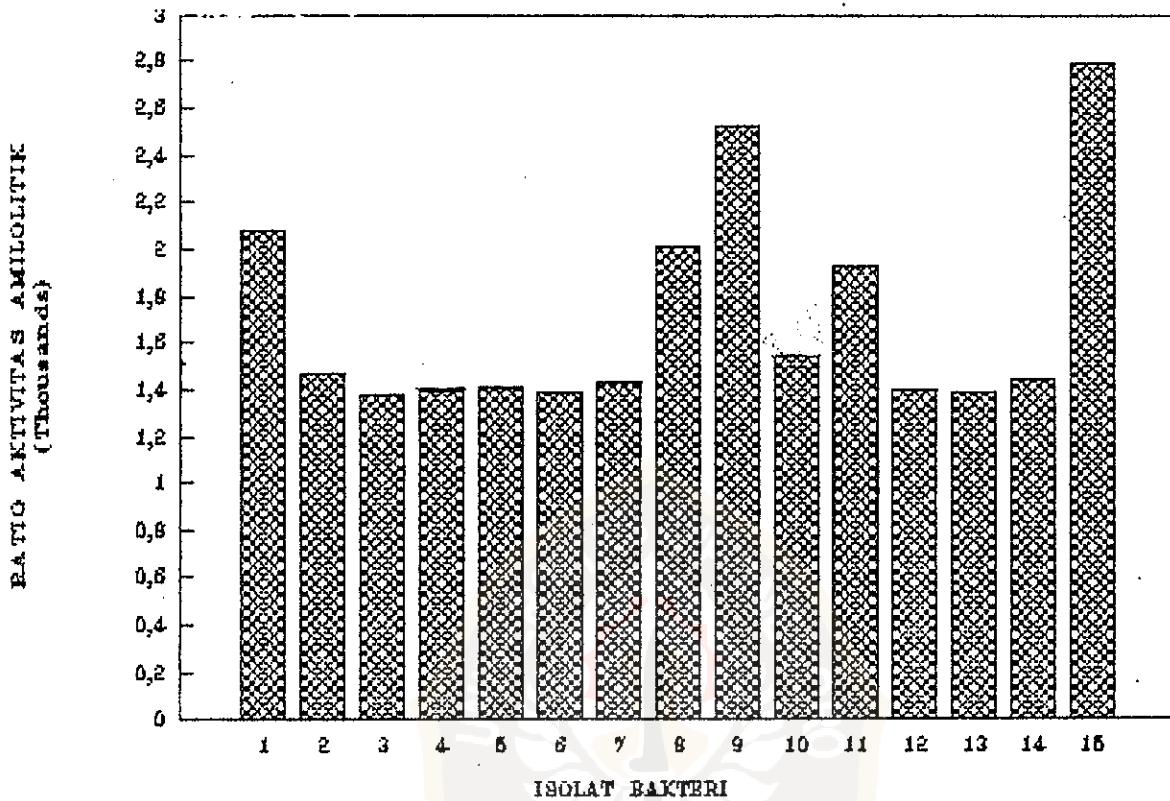
No.	Kode isolat	(C) diameter koloni (mm)	(L) diameter zone hidrolisis(mm)	(L/C) ratio aktivitas
1.	sp A1	7 13 7	17 20 16	2,084
2.	sp A3	12 15 14	19 20 21	1,472
3.	sp A5	8,5 9 7,5	12 12 11	1,370
4.	sp A7	6 7 5	8 8 7,5	1,412
5.	sp B2	15 9 11	20 14 15	1,415
6.	sp B4	16 16 11	21 21 17	1,390
7.	sp C2	7 6 8	8 9 11	1,431
8.	sp C4	8 7 8	15 15 16	2,006
9.	sp C5	4 4 5	10 9 14	2,516
10.	sp C6	4,7 5 5,5	8 8 7,5	1,480
11.	sp C7	8 14 7	16 19 17	1,928
12.	sp C8	8 9 7	10 12 11,5	1,397

13.	sp C11	8 17 10	12 20 15	1,392
14.	sp C12	5 4,5 5	8 6 7	1,430
B. Subti- lis ATCC 6633		8 5 5	26 15 17	2,789

Sumber : Data Primer oleh Siti Nur Jannah, 1994.



Lampiran 04. Histogram Ratio Aktivitas Amilolitik Isolat Bakteri Bacillus sp.



Keterangan :

- |          |            |                                  |
|----------|------------|----------------------------------|
| 1. Sp A1 | 8. Sp C4   | 15. <u>B. subtilis</u> ATCC 6633 |
| 2. Sp A3 | 9. Sp C5   |                                  |
| 3. Sp A5 | 10. Sp C6  |                                  |
| 4. Sp A7 | 11. Sp C7  |                                  |
| 5. Sp B2 | 12. Sp C8  |                                  |
| 6. Sp B4 | 13. Sp C11 |                                  |
| 7. Sp C2 | 14. Sp C12 |                                  |

Lampiran 05. Hasil Karakterisasi Isolat Bakteri Genus *Bacillus* Yang Menghasilkan Enzim Amilase.

Pengamatan	isolat bakteri													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Reaksi Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Motilitas	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Letak spora	C	V	C	C	C	C	C	C	C	C	C	V	V	C
Bentuk spora	X	X	X	X	Y	X	X	X	X	X	X	Y	X	X
Reaksi acid fast	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pembengkakan sel vegetatif	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Tumbuh pada														
- suhu 45°C	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
- suhu 65°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Penggunaan sitrat	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+
Tumbuh pada kondisi anaerob	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentasi KH														
- glukosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- Sukrosa	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- Laktosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- Arabinosa	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+
- Manitol	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
Hidrolisa kasein	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pembentukan indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pembentukan H <sub>2</sub> S	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
Reduksi nitrat	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Reduksi VP	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Reduksi MR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pencairan gelatin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Sumber : Data Primer oleh Siti Nur Jannah, 1994

Keterangan :

- |           |             |                    |
|-----------|-------------|--------------------|
| 1 = Sp A1 | 8 = Sp C4   | C = Central        |
| 2 = Sp A3 | 9 = Sp C5   | V = Sub terminal   |
| 3 = Sp A5 | 10 = Sp C6  | X = Oval           |
| 4 = Sp A7 | 11 = Sp C7  | Y = Bulat          |
| 5 = Sp B2 | 12 = Sp C8  | + = Reaksi positif |
| 6 = Sp B4 | 13 = Sp C11 | - = Reaksi negatif |
| 7 = Sp C2 | 14 = Sp C12 |                    |

Lampiran 06.

Gambar 05. Daya Amilolitik Isolat Bakteri Pada Medium Agar Pati.



Keterangan :

- a. Koloni isolat bakteri
- b. Daerah bening di sekitar koloni



Gambar 06. Morfologi Sel Isolat Bakteri Sp C5 Umur 3 Hari Pada Medium Nutrien Agar. Perbesaran mikroskop 1000 x dengan pengecatan spora. ( a. Sel vegetatif b. endospora ).



Gambar 07. Morfologi Sel Isolat Bakteri Sp A1 Umur 3 Hari Pada medium Nutrien Agar. Perbesaran mikroskop 1000 x dengan pengecatan spora. ( a. Sel vegetatif b. endospora ).



Gambar 08. Morfologi Sel Isolat Bakteri Sp C4 Umur 3 Hari Pada Medium Nutrien Agar. Perbesaran mikroskop 1000 x dengan pengecatan spora. ( a. Sel vegetatif b. endospora ).



Gambar 09. Morfologi Sel Isolat Bakteri Sp C7 Umur 3 Hari Pada Medium Nutrien Agar. Perbesaran mikroskop 1000 x dengan pengecatan spora. ( a. Sel vegetatif b. endospora ).



Lampiran 07. Karakterisasi *Bacillus* sp. Menurut Cowan (1974).Table 6.9 Second-stage table for *Bacillus*

	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>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3
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	T
Swelling of bacillary body	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at 45 °C	-	d	d	+	d	+	+	+	+	d	d	d	d	d	-	+	+	+	d
Growth at 65 °C	-	-	-	-	-	-	-	d <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	d
Growth at pH 5.7	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	d	d	-	+	+	+	+	+	d
Growth in 7% NaCl	+	d	+	+	+	+	+	-	+	-	-	d	-	-	-	-	-	-	d
Utilization of citrate	d	+	-	+	+	+	+	d	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-
Anaerobic growth in glucose broth	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	d	+	+	+	-	-	+	-
Carbohydrates, acid from:																			
glucose	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	-
arabinose	-	-	d	+	d	+	+	d	-	-	-	+	+	+	+	d	+	-	-
mannitol	-	-	+	+	d	+	+	d	-	-	-	+	-	+	+	d	+	-	-
xylose	-	-	d	+	d	+	+	d	-	-	-	+	-	+	+	d	+	-	-
V <sub>P</sub> test	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-
Starch hydrolysis	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Pyruvate reduction	+	+	+	+	d	-	+	d	d	d	d	d	d	+	+	+	+	+	-
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	d	-	-	+
Gelatin hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	d
Casein hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	d	d	d	+	+	+	+	+	+	+	+	d
Urease	-	d	-	d	d	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d
LV	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	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 firmus*  
 4 *Bacillus licheniformis*  
 5 *Bacillus megaterium*  
 6 *Bacillus pumilus*  
 7 *Bacillus subtilis*

- 8 *Bacillus coagulans*  
 9 *Bacillus pantothenicus*  
 10 *Bacillus lizeli*  
 11 *Bacillus brevis*  
 12 *Bacillus circulans*  
 13 *Bacillus laterosporus*  
 14 *Bacillus macevanus*

- 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.  
<sup>i</sup> 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 08. Media, Zat Warna, Reagen, Dan Indikator.

A. Media.

1. Nutrien agar. Ekstrak daging 3 gr, pepton 10 gr, agar 20 gr/liter. Sterilisasi pada otoklaf dengan suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit. (Salle, 1973).
2. Agar pati.  
Ekstrak daging 3 gr, pepton 5 gr, agar 15 gr ditambahkan dengan pati singkong 4 gr/ liter. Sterilisasi pada otoklaf dengan suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit.
3. Medium untuk uji fermentasi karbohidrat, dengan ekstrak daging 3 gr, pepton 10 gr, glukosa 5 ditambah dengan karbohidrat (glukosa, arabinosa, maltosa, sukrosa, laktosa) masing-masing 5 gr dan ditambah dengan indikator Biru Bromthymol 1 ml/liter. Ditambah dengan 1N NaOH agar pH nya 7,2. Sterilisasi pada otoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit.
4. Medium untuk uji hidrolisis protein, berupa medium untuk pembentukan indol (trypton cair) dengan komposisi tripton 10 gr dilarutkan dalam 1 liter air suling; untuk hidrolisis kasein (agar susu skim) dengan komposisi pepton 1 gr, agar 20 gr/ liter, ditambah dengan skim milk powder 50 gr/ liter; medium untuk pembentukan gas  $\text{H}_2\text{S}$  ( TSIA ) dengan komposisi lab lemco powder 3gr, yeast ekstrak 3 gr, pepton 20 gr, NaCl 5gr, laktosa 10gr, sukrosa 10, dekstrosa 10gr, ferisitat 1gr, Na tiosulfat 0,3 gr,

merah fenol 0,05gr, agar 15gr/liter air suling. Medium untuk pencairan gelatin (Nutrien gelatin) dengan komposisi berupa ekstrak daging 3 gr, pepton 10 gr, gelatin 150 gr/liter. Sterilisasi pada otoklaf dengan suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit.

5. Medium untuk uji reaksi katalase dengan komposisi ekstrak daging 3 gr, pepton 5 gr, dan agar 15 gr/liter. Sterilisasi pada otoklaf dengan suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit.

6. Medium untuk uji reduksi nitrat (nitrat cair) dengan komposisi ekstrak daging 3gr, pepton 5 gr, potasium nitrat ( $\text{KNO}_3$ ) 1 gr/ liter. Sterilisasi pada otoklaf dengan suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit.

7. Medium untuk reduksi merah metil dan Voges Proskauer (merah metil cair) dengan komposisi: proteose pepton 5 gr, potasium fosfat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) 5 gr, glukosa 5 gr/ liter air suling. Sterilisasi pada otoklaf dengan suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit.

8. Medium untuk uji penggunaan sitrat (Simmon Citrat agar) dengan komposisi  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,2 gr,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  0,2 gr, Na amonium sulfat 0,8 gr, Na sitrat 2,0, NaCl 5,0 gr, Bromthymol biru 0,08 gr, agar 15 gr/liter aquadest. Sterilisasi pada otoklaf dengan suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit.

#### B. ZAT WARNA, REAGEN, DAN INDIKATOR.

1. Pewarna Gram, terdiri dari :

a. Gram A dengan komposisi : larutan A (crystal

- violet 2 gr; alkohol 95% 20 ml) dan larutan B (amonium oxalat 0,8 gr, aquadest 80 ml)
- b. Gram B dengan komposisi : Iodine 1 gr, Potasium iodida 2 gr, aquadest 300 ml.
  - c. Gram C dengan komposisi : alkohol 95% 700 ml, acetone 300 ml.
  - d. Gram D dengan komposisi : safranin 0,25 gr, alkohol 95% 10 ml, aquadest 100 ml.
2. Pengecatan spora, terdiri dari :
- a. Klein A dengan komposisi Basic fuchsin 1 gr, Alkohol 96% 10 cc, Fenol 5% 90 cc.
  - b. Klein B dengan komposisi : Asam sulfat ( $H_2SO_4$ ) pekat 1cc, alkohol 96% 99 cc.
  - c. Klein C dengan komposisi metilin blue 0,2%.
3. Pengecatan acid fast, terdiri dari :
- a. ZNA dengan komposisi : Basic fuchsin 0,3 gr, alkohol (95%) 10 cc, Fenol kristal 5 gr, Aquadest 95 cc.
  - b. ZN B dengan komposisi : HCl (37%) 3 cc, alkohol 95% 100 cc.
  - c. ZN C, terdiri dari :
    - Larutan A (biru matilen 0,3 gr; alkohol 95% 30 cc).
    - Larutan B ( KOH 0,01 % 100 cc). Larutan A dan B dicampur hingga homogen.
4. Reagen untuk tes uji reduksi nitrat, terdiri dari :  
Asam sulfanilat (asam sulfanilat 8 gr,  $H_2SO_4$  48 ml)

dan  $\alpha$ -naftil amin ( $\alpha$ -naftilamin 5gr,  $H_2SO_4$  8 ml, aquadest 1000 ml).

5. Hidrogen peroksida 3% untuk uji reaksi katalase.
6. Larutan lugol-Jod (gram B) untuk uji hidrolisis amilum.
7. Reagen kovac untuk uji pembentukan indol.
8. Reagen untuk uji Voges-Proskauer terdiri dari Larutan  $\alpha$ -naphtol ( $\alpha$ -naftol 5 gr, alkohol 95% 100 ml) dan KOH 40% (KOH 40 gr, aquades 100 ml)
9. Larutan merah metil (untuk uji reduksi merah metil) terdiri dari methyl red 0,1 mgr, alkohol 95% 250 ml, aquades 250 ml.

