

LAMPIRAN



Lampiran 01. Analisis Hasil Pengukuran Aktifitas Enzim Selulase dengan
 Perlakuan Suhu Inkubasi (S) dan Jenis Isolat Bakteri (G).

Tabel 05. Analisis aktifitas enzim selulase (unit/ml filtrat/menit) dengan perlakuan suhu inkubasi (S) dan jenis isolat bakteri (G)

Perlakuan		Ulangan			TGS	\bar{TGS}
Jenis Isolat Bakteri	Suhu Inkubasi	1	2	3		
G1	S1	0.04393	0.03309	0.01512	0.09214	0.03071
	S2	0.06963	0.05684	0.07731	0.20378	0.06793
	S3	0.08227	0.08921	0.04057	0.21205	0.07068
	S4	0.07739	0.09223	0.05921	0.22883	0.07628
	S5	0.02720	0.03030	0.02231	0.07981	0.02660
	S6	0.02535	0.03686	0.01423	0.07644	0.02548
G2	S1	0.01003	0.03141	0.01080	0.05224	0.01741
	S2	0.05717	0.05644	0.02819	0.14180	0.04727
	S3	0.03328	0.06876	0.05352	0.15556	0.05185
	S4	0.05522	0.06400	0.04499	0.016421	0.05185
	S5	0.00272	0.01511	0.01625	0.03408	0.01136
	S6	0.01648	0.01333	0.00359	0.03340	0.01113
Jumlah		0.50067	0.58758	0.38609	1.47434	0.49145
Rerata		0.04172	0.04897	0.03217	0.12286	0.04095

Sumber : Data Primer Handayani, Agustus 2001

$$1. FK = (1,47434)^2/36 = 2,17368/36 = 0,06038$$

$$2. JKT = (0,04393^2 + 0,03309^2 + \dots + 0,00359^2) - FK = 0,02295$$

$$3. JKP = \frac{(0,09214^2 + 0,20378^2 + \dots + 0,03342^2)}{3} - FK$$

$$4. JKG = JKT - JKP = 0,02295 - 0,01823 = 0,00472$$

$$5. JKP_{(S)} = \frac{(0,14438^2 + 0,34558^2 + 0,36761^2 + 0,39304^2 + 0,11389^2 + 0,10984^2)}{3 \times 2} - FK = 0,01544$$

$$6. JKP_{(G)} = \frac{(0,89305^2 + 0,58129^2)}{3 \times 6} - FK = 0,0027$$

$$7. JK_{Interaksi} = JKP - JKP_{(S)} - JKP_{(G)} = 0,01823 - 0,01544 - 0,0027 = 0,00009$$

Tabel 06. Rerata aktifitas enzim selulase (unit/ml filtrat/menit) dengan perlakuan suhu inkubasi (S) dan jenis isolat bakteri (G)

Jenis Isolat Bakteri	Suhu Inkubasi					S6
	S1	S2	S3	S4	S5	
G1	0,09214	0,20378	0,21205	0,07981	0,07981	0,07644
G2	0,05224	0,14180	0,15556	0,16421	0,03408	0,03340
TS	0,14438	0,34558	0,36761	0,39304	0,11389	0,10984
TS	0,02406	0,05760	0,06127	0,06551	0,01898	0,01831

Tabel 07. Analisis sidik ragam aktifitas enzim selulase dengan perlakuan suhu inkubasi (S) dan jenis isolat bakteri (G)

Sumber Keragaman	Derajat Bebas (DB)	Jumlah Kuadrat (JK)	Kuadrat Tengah (KT)	F _{hitung}	F _{Tabel}	
					5%	1%
Perlakuan	11	0.01823	0.00166	13,71*	4.26	7.82
Jenis Isolat Bakteri	1	0.00270	0.00270	15.69*	2.62	3.90
Suhu Inkubasi	5	0.01544	0.00309	0.09 ^{tn}	2.62	3.90
Interaksi	5	0.00009	0.000018			
Galat	24	0.00472	0.000197			
Total	35	0.02295				

Keterangan : tn = berbeda tidak nyata
* = berbeda nyata

Kesimpulan : Ada pengaruh jenis isolat bakteri terhadap aktifitas enzim selulase
Ada pengaruh suhu inkubasi terhadap aktifitas enzim selulase
Tidak ada pengaruh karena interaksi jenis isolat bakteri dan suhu inkubasi terhadap aktifitas enzim selulase

Perhitungan analisis dengan uji lanjut

A. Uji jarak berganda Duncan pada taraf signifikan 5% terhadap aktifitas enzim selulase dengan perlakuan jenis isolat bakteri (G)

$$S_y = \sqrt{KTG/n} = \sqrt{0.000197/(3 \times 6)} \\ = 0,00331$$

P	rp	Rp = rp x Sy
2 (5%)	2,93	0,00970
(1%)	3,97	0,01314

Tabel 08. Uji jarak berganda Duncan pada taraf signifikan 5% terhadap aktifitas enzim selulase (unit/ml filtrat/menit) dengan perlakuan jenis isolat bakteri (G)

Jenis Isolat Bakteri	G2 (0.03229)	G1 (0.04961)
G1 (0.04961)	0.01732*	-
G2 (0.03229)	-	-

Keterangan : tanda superskrip * menunjukkan rerata perlakuan berbeda nyata berdasar uji jarak berganda Duncan pada taraf signifikan 5%

Kesimpulan : Antara G1 dan G2 berbeda nyata berdasar uji jarak berganda Duncan pada taraf signifikan 5%

B. Uji jarak berganda Duncan pada taraf signifikan 5% terhadap aktifitas enzim selulase dengan perlakuan suhu inkubasi

$$S_y = \sqrt{KTG / n} = \sqrt{0.000197 / (3 \times 2)} \\ = 0,00573$$

P	2	3	4	5	6
5% rp	2,93	3,08	3,16	3,23	3,28
Rp	0,01679	0,01765	0,01811	0,01851	0,01879
1% rp	3,97	4,16	4,26	4,33	4,41
Rp	0,02275	0,02384	0,02441	0,02481	0,02527
S6	S5	S1	S2	S3	S4
0,01831	0,01898	0,02406	0,05760	0,06127	0,06551
b			a		

Keterangan : garis yang sama menunjukkan rerata perlakuan berbeda tidak nyata berdasar uji jarak berganda Duncan pada taraf signifikan 5%

Tabel 09. Uji jarak berganda Duncan pada taraf signifikan 5% terhadap aktifitas enzim selulase (unit/ml filtrat/menit) dengan perlakuan suhu inkubasi (S)

Suhu Inkubasi	S6 (0,01831)	S5 (0,01898)	S1 (0,02406)	S2 (0,05760)	S3 (0,06127)	S4 (0,06551)
S6 (0,01831)	-					
S5 (0,01898)	0,00067	-				
S1 (0,02406)	0,00508	0,00508	-			
S2 (0,05760)	0,03929*	0,03862*	0,03354*	-		
S3 (0,06127)	0,04296*	0,04229*	0,03721*	0,00367	-	
S4 (0,06551)	0,04720*	0,04653*	0,04145*	0,00791	0,00424	-

Keterangan : tanda superskrip * menunjukkan rerata perlakuan berbeda nyata berdasar uji jarak berganda Duncan pada taraf signifikan 5%



Lampiran 02. Hasil Pengukuran Penambahan Biomassa/Kurva Pertumbuhan, Kadar Protein, Kadar Gula Reduksi, Aktifitas (Produksi) Enzim Selulase dan Aktifitas Spesifik Enzim Selulase tiap 6 Jam Sekali dari Isolat Bakteri Selulolitik

Tabel 10. Hasil pengukuran penambahan biomassa/kurva pertumbuhan, kadar protein, kadar gula reduksi, produksi (aktifitas) enzim selulase dan aktifitas spesifik enzim selulase tiap 6 jam sekali dari isolat bakteri *Bacillus* sp. dan *Pseudomonas* sp. yang diagitasi pada kecepatan 300 rpm selama 30 jam pada suhu kamar

Waktu Inkubasi/T (jam)	Kurva Pertumbuhan (OD)		Kadar Protein (mg/ml)		Kadar Gula Reduksi (mg/ml)		Aktifitas Enzim Selulase (Unit/ml/ment)		Aktifitas Spesifik Enzim Selulase (Unit/mg protein)	
	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.
T0	0.63989	0.42393	3.37879	2.51719	0.02774	0.00755	0.01027	0.00280	0.00304	0.00111
T1	1.61781	0.83070	4.32866	4.30372	0.07690	0.04010	0.02848	0.01485	0.00658	0.00345
T2	2.41088	1.14074	4.80817	4.35366	0.11430	0.04925	0.04233	0.01824	0.00880	0.00419
T3	1.70696	0.69560	4.30372	3.59407	0.02692	0.03250	0.00997	0.01204	0.00232	0.00335
T4	1.38466	0.59982	4.17959	2.79262	0.01493	0.01488	0.00553	0.00551	0.00132	0.00197
T5	1.12383	0.52076	2.65442	1.62530	0.00826	0.00493	0.00306	0.00183	0.00115	0.00112

Sumber : Data Primer Handayani, Agustus 2001

Lampiran 03. Hasil Pengukuran Kadar Gula Reduksi pada Perlakuan Suhu Inkubasi (S) dan Jenis Isolat Bakteri (G)

Tabel 11. Hasil pengukuran kadar gula reduksi pada berbagai suhu inkubasi dari isolat bakteri *Bacillus* sp. dan *Pseudomonas* sp.

Jenis Isolat Bakteri	Suhu Inkubasi	<i>Bacillus</i> sp.		<i>Pseudomonas</i> sp.	
		OD	mg/ml	OD	mg/ml
Ulangan	K	0.06120	0.08745	0.01323	0.12635
	S1	0.02780	0.20607	0.01818	0.15344
	S2	0.04048	0.27545	0.04144	0.20870
	S3	0.04672	0.30959	0.02965	0.21620
	S4	0.04431	0.29641	0.04048	0.27545
	S5	0.01954	0.16088	0.01457	0.13369
1	S6	0.01863	0.15590	0.02136	0.17084
	K	0.01100	0.11415	0.00087	0.05873
	S1	0.02733	0.20350	0.01637	0.14353
	S2	0.03905	0.26763	0.02872	0.21111
	S3	0.05502	0.35501	0.03450	0.24437
	S4	0.05651	0.36316	0.03245	0.23152
2	S5	0.02595	0.19595	0.00833	0.09954
	S6	0.02919	0.21368	0.00745	0.09473
	K	0.00043	0.05632	0.00745	0.09473
	S1	0.00789	0.09714	0.01278	0.12389
	S2	0.03858	0.26506	0.02136	0.17084
	S3	0.02045	0.16586	0.03386	0.23923
3	S4	0.02965	0.21620	0.02965	0.21620
	S5	0.01144	0.11656	0.01547	0.13861
	S6	0.00745	0.09473	0.00922	0.10441
	K	0.00043	0.05632	0.00745	0.09473
	S1	0.00789	0.09714	0.01278	0.12389
	S2	0.03858	0.26506	0.02136	0.17084

Sumber : Data primer Handayani, Agustus 2001

Keterangan : K (kontrol) = filtrat enzim dan CMC tanpa diinkubasi selama 30 menit OD = "optical density" (kerapatan optik)
 S1 = suhu inkubasi 30° C ΔKGR = total kandungan gula reduksi
 S2 = suhu inkubasi 37° C
 S3 = suhu inkubasi 40° C
 S4 = suhu inkubasi 50° C
 S5 = suhu inkubasi 60° C
 S6 = suhu inkubasi 70° C

Lampiran 04. Hasil Pengukuran Kadar Gula Reduksi, Aktifitas Enzim Selulase dan Aktifitas Spesifik Enzim Selulase pada Perlakuan Suhu Inkubasi (S) yang Berbeda dari Isolat Bakteri Selulolitik beserta Parameter Pendukungnya

Tabel 12. Hasil pengukuran kadar gula reduksi, aktifitas enzim selulase dan aktifitas spesifik enzim selulase pada perlakuan suhu inkubasi yang berbeda dari isolat bakteri *Bacillus* sp. beserta parameter pendukung berupa nilai pH, berat kering sel dan kadar protein

Ulangan	Nilai pH		Berat Kering Sel (mg/ml)		BKS	OD	Kadar Protein		Suhu Inkubasi	Kadar Gula Reduksi (mg/ml)	Aktifitas Enzim Selulase (unit/ml/ment)	Aktifitas Spesifik Enzim Selulase (unit/mg protein)
	Awal	Akhir	Awal	Akhir			Protein (mg/ml)	Protein (mg/ml)				
									S1	0.11862	0.04393	0.02247
									S2	0.18800	0.06963	0.03561
1	7.0	6.7	1.5	1.9	0.4	0.40959	1.95518		S3	0.22214	0.08227	0.04208
									S4	0.20896	0.07739	0.03958
									S5	0.07343	0.02720	0.01391
									S6	0.06845	0.02535	0.01297
									S1	0.08935	0.03309	0.01431
									S2	0.15348	0.05684	0.02458
2	7.0	6.8	2.0	2.6	0.6	0.48662	2.31302		S3	0.24086	0.08921	0.03857
									S4	0.24901	0.09223	0.03987
									S5	0.08180	0.03030	0.01310
									S6	0.09953	0.03686	0.01594
									S1	0.04082	0.01512	0.00647
									S2	0.20874	0.07731	0.03310
3	7.0	6.8	1.1	1.8	0.7	0.49149	2.33565		S3	0.10954	0.04057	0.01737
									S4	0.15988	0.05921	0.02535
									S5	0.06024	0.02231	0.00955
									S6	0.03841	0.01423	0.00609

Sumber data primer : Handayani, Agustus 2001

Keterangan : pH = derajat keasaman

OD = "optical density" (kerapatan optik)

Tabel 13. Hasil pengukuran kadar gula reduksi, aktifitas enzim selulase dan aktifitas spesifik enzim selulase pada perlakuan suhu inkubasi yang berbeda dari isolat bakteri *Pseudomonas* sp. beserta parameter pendukung berupa nilai pH, berat kering sel dan kadar protein

Ujangan	Nilai pH		Berat Kering Sel (mg/ml)		BKS	OD	Kadar Protein		Suhu Inkubasi	Kadar Gula Reduksi (mg/ml)	Aktifitas Enzim Selulase (unit/ml/ment)	Aktifitas Spesifik Enzim Selulase (unit/mg protein)
	Awal	Akhir	Awal	Akhir			Protein (mg/ml)	Protein (mg/ml)				
									S1	0.02709	0.01003	0.00365
									S2	0.15435	0.05717	0.02081
									S3	0.08985	0.03328	0.01212
1	7.0	6.9	1.0	1.7	0.7	0.57992	2.74645		S4	0.14910	0.05522	0.02011
									S5	0.00734	0.00272	0.00099
									S6	0.04449	0.01648	0.00600
									S1	0.08480	0.03141	0.02337
									S2	0.15238	0.05644	0.04200
									S3	0.18564	0.06876	0.05117
2	7.0	6.8	1.3	1.6	0.3	0.27797	1.34374		S4	0.17279	0.06400	0.04763
									S5	0.04081	0.01511	0.01125
									S6	0.03600	0.01333	0.00992
									S1	0.02916	0.01080	0.00506
									S2	0.07611	0.02819	0.01321
									S3	0.14450	0.05352	0.02509
3	7.0	6.9	1.4	1.8	0.4	0.44793	2.13329		S4	0.12147	0.04499	0.02109
									S5	0.04388	0.01625	0.00762
									S6	0.00968	0.00359	0.00168

Sumber data primer : Handayani, Agustus 2001

Keterangan : pH = derajat keasaman

OD = "optical density" (kerapatan optik)

Lampiran 05. Pembuatan kurva larutan glukosa standar

Tabel 14. Analisis regresi dan korelasi larutan glukosa standar

X	Y	X ²	XY	Y ²
0,2	0,02457	0,04	0,004914	0,000603684
0,4	0,06298	0,16	0,025192	0,003966480
0,6	0,10127	0,36	0,060762	0,010255612
0,8	0,14267	0,64	0,114136	0,020354728
1,0	0,16749	1,00	0,167490	0,028052900

$$\Sigma X=3,0 \quad \Sigma Y=0,49898 \quad \Sigma X^2=2,2 \quad \Sigma XY=0,372494$$

$$X=0,6 \quad \bar{Y}=0,099796 \quad \Sigma Y^2=0,063233404$$

Persamaan kurva

$$Y = a + bX$$

$$b = \frac{n \cdot \Sigma XY - \Sigma X \cdot \Sigma Y}{n \cdot \Sigma X^2 - (\Sigma X)^2}$$

$$= \frac{5 \cdot 0,372494 - 3,0 \cdot 0,49898}{5 \cdot 2,2 - 9} = 0,182765$$

$$Y = a + bX$$

$$a = Y - bX$$

$$a = 0,099796 - (0,182765 \cdot 0,6)$$

$$= -0,009863$$

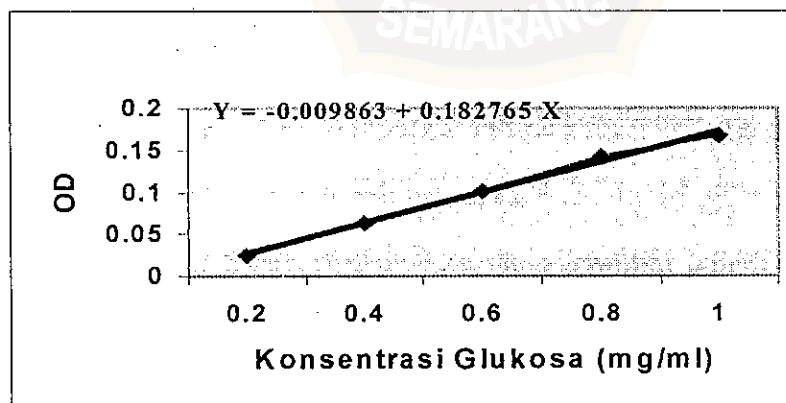
$$Y = -0,009863 + 0,182765 X$$

$$\delta X^2 = n \cdot \Sigma X^2 - (\Sigma X)^2 = 5 \cdot 2,2 - 9 = 2$$

$$\delta Y^2 = n \cdot \Sigma Y^2 - (\Sigma Y)^2 = 5 \cdot 0,063233404 - 0,24898104 = 0,06718598$$

$$\delta XY = n \cdot \Sigma XY - \Sigma X \cdot \Sigma Y = 5 \cdot 0,372494 - 3,0 \cdot 0,49898 = 0,36553$$

$$r = \frac{\delta XY}{\sqrt{\delta X^2} \cdot \sqrt{\delta Y^2}} = 0,997$$



Gambar 11. Kurva larutan glukosa standar

Lampiran 06. Pembuatan kurva larutan "bovine serum albumin (BSA) standar

Tabel 15. Analisis regresi dan korelasi larutan "bovine serum albumin" (BSA) standar

X	Y	X ²	XY	Y ²
0,06	0,006564	0,0036	0,00039384	0,000043086
0,12	0,013228	0,0144	0,00158736	0,000174979
0,18	0,019997	0,0324	0,00359946	0,000399880
0,24	0,039529	0,0579	0,00948696	0,001562541
0,30	0,057992	0,0900	0,01739760	0,003363072

$$\Sigma X=0,9 \quad \Sigma Y=0,13731 \quad \Sigma X^2=0,198 \quad \Sigma XY=0,03246522$$

$$X=0,18 \quad \bar{Y}=0,027462 \quad \Sigma Y^2=0,005543558$$

Persamaan kurva

$$Y = a + bX$$

$$b = \frac{n \cdot \Sigma XY - \Sigma X \cdot \Sigma Y}{n \cdot \Sigma X^2 - (\Sigma X)^2}$$

$$= \frac{5 \cdot 0,03246522 - 0,9 \cdot 0,13731}{5 \cdot 0,198 - 0,81} = 0,215261666$$

$$Y = a + bX$$

$$a = Y - bX$$

$$a = 0,027462 - (0,215261666 \cdot 0,18)$$

$$= -0,011285099$$

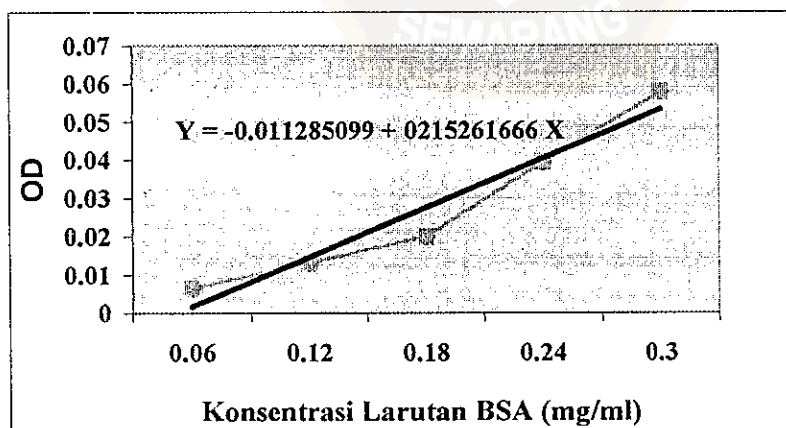
$$Y = -0,011285099 + 0,215261666 X$$

$$\delta X^2 = n \cdot \Sigma X^2 - (\Sigma X)^2 = 5 \cdot 0,198 - (0,9)^2 = 0,18$$

$$\delta Y^2 = n \cdot \Sigma Y^2 - (\Sigma Y)^2 = 5 \cdot 0,005543558 - (0,13731)^2 = 0,008863753$$

$$\delta XY = n \cdot \Sigma XY - \Sigma X \cdot \Sigma Y = 5 \cdot 0,03246522 - 0,9 \cdot 0,13731 = 0,0387471$$

$$r = \frac{\delta XY}{\sqrt{\delta X^2} \cdot \sqrt{\delta Y^2}} = 0,97$$



Gambar 12. Kurva larutan "bovine serum albumin" (BSA) standar

Lampiran 07. Pembuatan media 'screening' dan pertumbuhan bakteri selulolitik

Media "Cellulolytic Agar with Sea Salt" (CAWSS)

Komposisi per Liter (1000 ml)

- Agar 20,00 g
- NH_4Cl 2,00 g
- K_2HPO_4 1,65 g
- Ekstrak yeast 1,20 g
- Sistein HCl. H_2O 0,50 g
- Air laut yang disaring 200 ml
- Suspensi Selulosa/CMC (4% b/v) 200 ml
- Larutan mineral 150 ml
- Bromcresol purple/BCP (0,1% b/v) 1 ml

Suspensi Selulosa/CMC (4% b/v)

Komposisi per 200 ml

Bubuk selulosa (carboxymethyl cellulose) sebanyak 8 g ditambahkan ke dalam 200 ml akuades, kemudian dicampur secara merata.

Larutan Mineral

Komposisi per Liter (1000 ml)

- NaCl 6,0 g
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 6,0 g
- MgSO_4 0,6 g
- CaCl_2 0,6 g

Semua bahan dimasukkan ke dalam akuades, dan ditepatkan volumenya hingga 1000 ml. Dicampur secara merata. Diatur pH pada 7,0 dengan 5 M NaOH, kemudian dimasukkan ke dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm.

Media "Cellulolytic Broth with Sea Salt" (CBWSS)

Komposisi per Liter (1000 ml)

- NH_4Cl 2,00 g
- K_2HPO_4 1,65 g
- Ekstrak yeast 1,20 g
- Sistein HCl. H_2O 0,50 g
- Air laut yang disaring 200 ml
- Suspensi Selulosa/CMC (4% b/v) 200 ml
- Larutan mineral 150 ml
- Bromocresol purple/BCP (0,1% b/v) 1 ml

Semua bahan dimasukkan ke dalam akuades, dan ditepatkan volumenya hingga 1000 ml. Dicampur secara merata. Diatur pH pada 7,0 dengan 5 M NaOH, kemudian dimasukkan ke dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm.

Lampiran 08. Pembuatan media dasar pemeliharaan dan peremajaan kultur bakteri

Media Dasar "Nutrient Agar" (NA)

Komposisi per Liter (1000 ml)

- Agar 15 g
- Pepton 5 g
- Ekstrak daging 3 g

Semua bahan dimasukkan ke dalam akuades dan ditepatkan volumenya hingga 1000 ml, kemudian dimasukkan ke dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm.

Lampiran 09. Pembuatan media dasar “nutrient broth” (NB) (Cowan dan Steel’s, 1974)

Media Dasar “Nutrient Broth” (NB)

Komposisi per Liter (1000 ml)

- | | |
|------------------|---------|
| • Ekstrak daging | 10 g |
| • Pepton | 10 g |
| • NaCl | 5 g |
| • Akuades | 1000 ml |

Dilarutkan bahan-bahan dengan cara memanaskannya dalam air mendidih selama 10 menit. Diatur pada pH 7,2 dan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121⁰ C, tekanan 2 atm selama 15 menit .

Lampiran 10. Pembuatan media uji fermentasi karbohidrat (glukosa) (Cowan and Steel’s, 1974)

Media “Glucose Broth”

Komposisi per Liter (1000 ml)

- | | |
|---------------------------|--------|
| • Larutan glukosa 20% b/v | 50 ml |
| • Nutrien broth | 950 ml |
| • Fenol merah | |

Larutan glukosa disterilisasi dengan cara “tyndalisasi” sedangkan media NB dimasukkan ke dalam autoklaf dan disterilisasi pada suhu 121⁰ C, tekanan 2 atm selama 15 menit. Larutan glukosa yang telah disterilkan ditambahkan secara aseptis ke dalam media NB. Selanjutnya dicampurkan dan dibagikan ke dalam tabung reaksi steril dengan volume 10 ml secara aseptis.

Lampiran 11. Pembuatan media uji oksidasi/fermentasi (OF) karbohidrat (Glukosa) (Hugh and Leifson, 1953 dalam Cowan and Steel's, 1974)

Media Uji OF Glukosa

Komposisi per Liter (1000 ml)

- Pepton 2 g
- NaCl 5 g
- K₂HPO₄ 0,3 g
- Agar 3 g
- Akuades 1000 ml
- Bromthymol blue (0,2% b/v) 15 ml
- Larutan glukosa (1% b/v)

Dilarutkan bahan-bahan dengan cara memanaskannya dalam air mendidih selama 10 menit. Diatur pada pH 7,1 dan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121⁰ C, tekanan 2 atm selama 15 menit.

Ditambahkan larutan glukosa steril secara aseptis untuk memberikan konsentrasi akhir 1% . Dicampur dan dibagikan secara aseptis ke dalam tabung reaksi steril dengan volume sebanyak 10 ml

Lampiran 12. Pembuatan larutan pewarnaan spora bakteri (Pewarnaan Klein)

Larutan Pewarnaan Spora Bakteri (Klein)

Komposisi

Klein A

- Basic fuchsin 1 g
- Alkohol 96% v/v 10 cc
- Fenol 5% b/v 90 cc

Klein B

- Asam sulfat pekat 1 cc
- Alkohol 96% v/v 99 cc

Klein C

- Metilen biru 0,2% b/v 100 ml

Lampiran 13. Pembuatan larutan carboxymethyl cellulose/CMC 1% b/v

Larutan Carboxymethyl Cellulose (CMC) 1% b/v

Komposisi per 100 ml

- Carboxymethyl cellulose (CMC) 1 g
- Buffer sitrat pH 4,8; 0,5 M 10 ml
- Merthiolate 1% 1 ml
- Akuades

CMC sebanyak 1 g dilarutkan dalam 80 ml akuades dan dipanaskan hingga mencapai suhu 80-90⁰ C sambil dikocok secara kontinyu. Selanjutnya ditambah 10 ml buffer sitrat pH 4,8 dalam 1 ml merthiolate 1% b/v dan ditepatkan volumenya hingga 100 ml. Larutan dimasukkan ke dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121⁰ C dan tekanan 2 atm. Larutan disimpan dalam lemari pendingin dan dipanaskan pada suhu 50⁰ C sebelum digunakan.

Lampiran 14. Pembuatan larutan glukosa standar

Larutan Glukosa Standar

Komposisi per 100 ml

Glukosa	100 mg
Akuades	100 ml

Dibuat larutan glukosa dengan konsentrasi 1 mg/ml dengan cara melarutkan 100 mg glukosa ke dalam 100 ml akuades dengan cara dipanaskan hingga semua

glukosa terlarutkan. Dilakukan pengenceran untuk mendapatkan konsentrasi 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 dan 1,0 mg/ml dengan cara :

Tabel 16. Pembuatan larutan glukosa standar dengan konsentrasi yang berbeda

Tabung	(ml) Larutan Glukosa	(ml) Akuades	(mg) Glukosa per (ml)
1	0,0	1,0	0,0
2	0,2	0,8	0,2
3	0,4	0,6	0,4
4	0,6	0,4	0,6
5	0,8	0,2	0,8
6	1,0	0,0	1,0

Lampiran 15. Pembuatan larutan pereduksi asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS)

Larutan Pereduksi Asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS)

Komposisi per 100 ml

- DNS (asam dinitrosalisilat) 1 g
- NaOH 2 N 20 ml
- Garam Rochele (K/Na tartrat) 30 g
- Akuades

DNS sebanyak 1 g dilarutkan dalam 20 ml larutan NaOH 2N ditambah 50 ml akuades, 30 g garam Rochele dan volumenya ditepatkan 100 ml dengan akuades. Larutan kemudian dipanaskan dalam air mendidih selama 30 menit pada suhu $\pm 100^{\circ}$ C.

Lampiran 16. Pembuatan larutan "bovine serum albumin" (BSA) standar

Larutan "Bovine Serum Albumin" (BSA)**Komposisi**

- BSA (Bovine Serum Albumin) 0,03 g
- Buffer sitrat pH 6,0; 0,01 M 100 ml
- Akuades

Dibuat larutan BSA dengan konsentrasi 0,3 mg/ml dengan cara melarutkan 0,03 g BSA ke dalam larutan buffer sitrat 0,01 M; pH 6,0 yang sebelumnya telah didinginkan pada suhu 10⁰ C selama 24 jam hingga mencapai volume 100 ml. Dilakukan pengenceran untuk mendapatkan konsentrasi 0,06; 0,12; 0,18; 0,24; 0,30 mg/ml dengan cara :

Tabel 17. Pembuatan larutan BSA standar dengan konsentrasi yang berbeda

Tabung	(ml) Larutan BSA	(ml) akuades	(mg) protein per (ml)
1	0,0	1,0	0,00
2	0,2	0,8	0,06
3	0,4	0,6	0,12
4	0,6	0,4	0,18
5	0,8	0,2	0,24
6	1,0	0,0	0,30

Lampiran 17. Pembuatan larutan pereaksi penentu kandungan protein (metode Lowry-Folin)

Larutan Pereaksi Penentu Kandungan Protein**Pereaksi A****Komposisi**

- Na₂CO₃ (anhidrat) 10 g
- NaOH 0,5 N 100 ml

Dilarutkan 10 g Na_2CO_3 (anhidrat) ke dalam NaOH 0,5 N hingga volume mencapai 100 ml.

Pereaksi B

Komposisi

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1 g
Akuades	100 ml

Dilarutkan 1 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ke dalam akuades hingga volume mencapai 100 ml.

Pereaksi C

Komposisi

K/Na tartrat	2 g
Akuades	100 ml

Dilarutkan 2 g K/Na tartrat ke dalam akuades hingga volume mencapai 100 ml.

Pereaksi D

Komposisi

Pereaksi A	15 ml
Pereaksi B	0,75 ml
Pereaksi C	0,75 ml

Dicampurkan antara 15 ml pereaksi A, 0,75 ml pereaksi B dan 0,75 ml pereaksi C. Dibuat pada saat akan digunakan.

Pereaksi E

Komposisi

Foin cicalteu 2 N	5 ml
Akuades	

Diencerkan 5 ml pereaksi foin cicalteu 2 N ke dalam akuades hingga volume mencapai 50 ml.

Lampiran 18. Pembuatan larutan penyangga “buffer” sitrat

Larutan Penyangga (“Buffer”) Sitrat

Komposisi

Asam sitrat 0,1 M	21,01 g
Natrium sitrat 0,1 M	29,41 g
Akuades	

Larutan A

Dilarutkan 21,01 g asam sitrat ke dalam akuades hingga volume mencapai 1000 ml

Larutan B

Dilarutkan 29,41 g natrium sitrat ($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$) ke dalam akuades hingga volume mencapai 1000 ml.

Buffer Sitrat pH 4,8; 0,5 M

Larutan A sebanyak 23,0 ml dicampur dengan 27,0 ml larutan B, kemudian diencerkan dengan akuades hingga volume mencapai 100 ml.

Buffer Sitrat pH 6,0; 0,01 M

Larutan A sebanyak 9,5 ml dicampur dengan 41,5 ml larutan B, kemudian diencerkan dengan akuades hingga volume mencapai 100 ml.

Lampiran 19. Pembuatan larutan natrium hidroksida (NaOH)

Larutan Natrium Hidroksida (NaOH)

Komposisi

NaOH
Akuades

Larutan NaOH 5 N; 5 M

NaOH sebanyak 20 g dilarutkan dalam akuades hingga volume mencapai 100 ml.

Larutan NaOH 2 N

NaOH sebanyak 8 g dilarutkan dalam akuades hingga volume mencapai 100 ml

Larutan NaOH 0,5 N

NaOH sebanyak 2 g dilarutkan dalam akuades hingga volume mencapai 100 ml.

