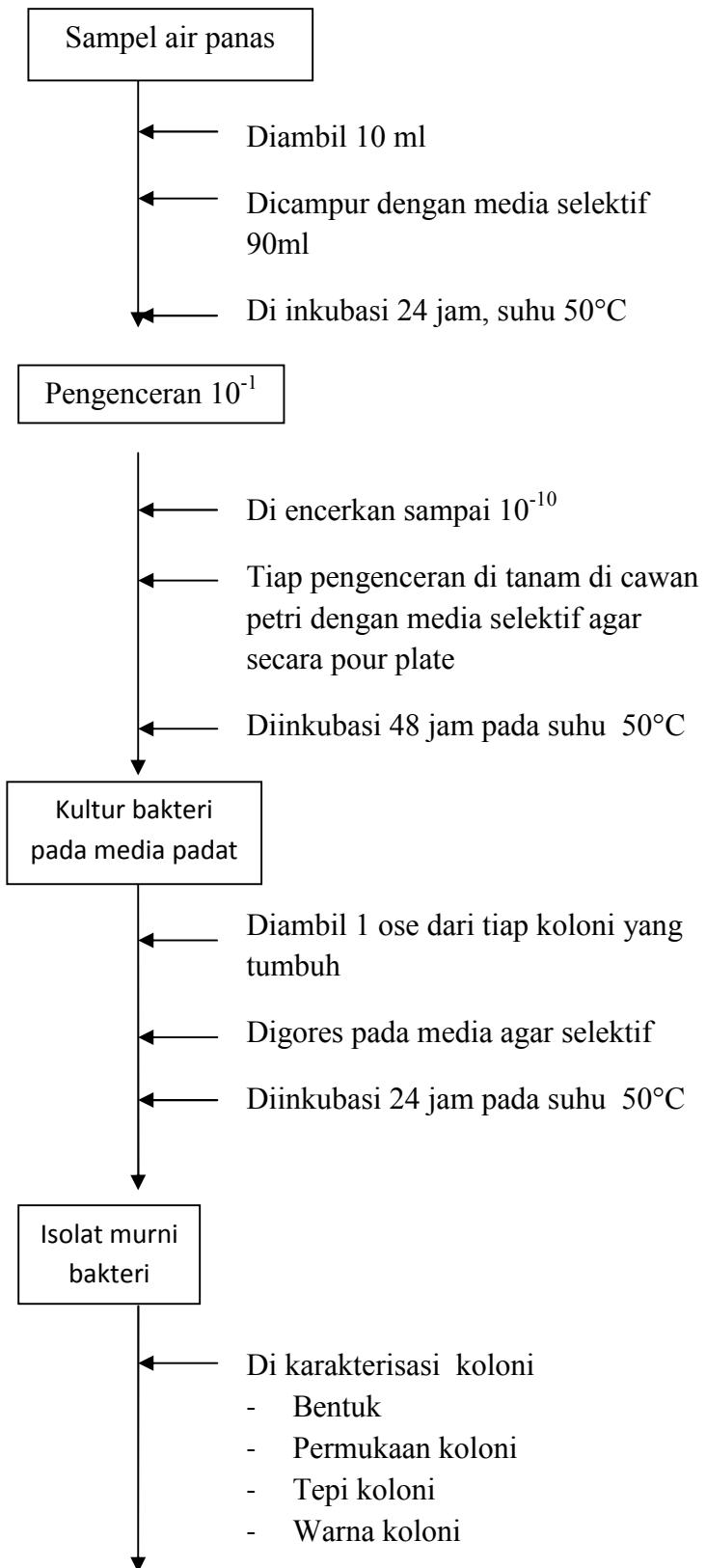
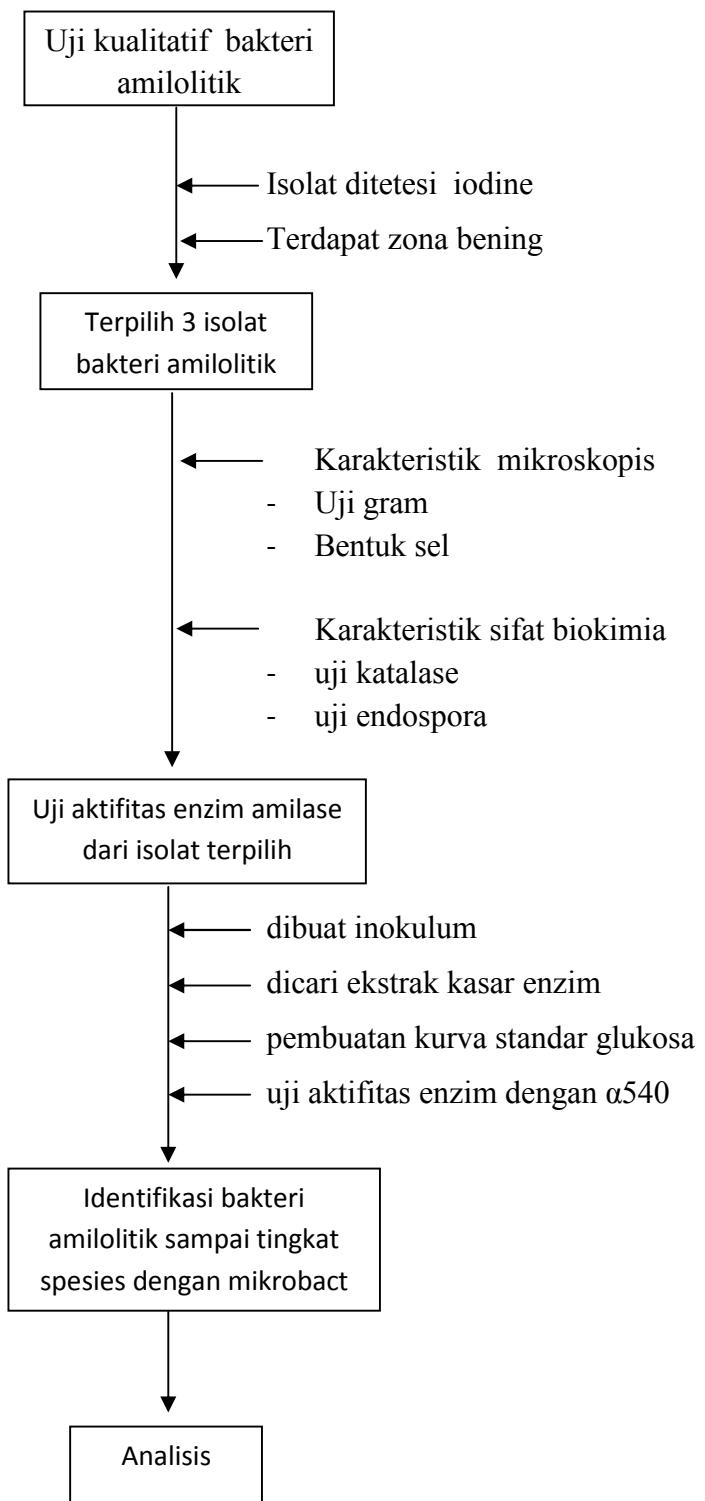


Lampiran 1. Metode kerja





2. Pembuatan Media

- **media selektif amilolitik agar**

pati 10 g, yeast ekstrak 2 g, bacto pepton 5 g, MgSO₄.7H₂O 0,5 g, NaCl 0,5 g, CaCl₂. 2H₂O 0,15 g, agar 20 g

- ↓
- Ditimbang (disesuaikan ukuran)
 - Ditambah aquades 1000 mL
 - Dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk hingga larut
 - Dimasukkan kedalam Erlenmeyer
 - Disterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit.

Hasil

- **media selektif amilolitik cair**

pati 10 g, yeast ekstrak 2 g, bacto pepton 5 g, MgSO₄.7H₂O 0,5 g, NaCl 0,5 g, CaCl₂. 2H₂O 0,15 g

- ↓
- Ditimbang (disesuaikan ukuran)
 - Ditambah aquades 1000 mL
 - Dicampur hingga larut
 - Dimasukkan kedalam Erlenmeyer
 - Disterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit.

Hasil

3. Identifikasi Bakteri (Mikroskopis dan Makroskopis)

- **Pewarnaan Gram** (Hadioetomo, 1999).

Isolat (24 jam)

- ↓
- Diambil sedikit dengan jarum oose secara aseptis
 - Disuspensikan dengan dengan aquades yang ada di atas gelas objek.
 - Difiksasi preparat diatas api bunsen sampai kering.

- Ditetesi dengan larutan kristal violet, didiamkan selama 60 detik, dicuci dengan air mengalir, dikeringkan.
- Ditetesi dengan larutan iodin, didiamkan selama 60 detik, dicuci dengan air mengalir, dikeringkan.
- Ditetesi dengan larutan alkohol 96 %, didiamkan selama 30 detik, dicuci dengan air mengalir, dikeringkan.
- Ditetesi dengan larutan safranin, didiamkan selama 30 detik, dicuci dengan air mengalir, dikeringkan.
- Ditetesi dengan minyak imersi, diamati dengan mikroskop (uji gram positif jika berwarna ungu dan negatif jika berwarna merah)

Hasil

- **Uji Katalase (Lay, 1994).**

Isolat (24 jam)

- Diambil sedikit secara aseptis dengan menggunakan jarum ose
- Disuspensikan dengan aquades steril yang ada di gelas obyek (yang sebelumnya disemprot gelas obyek dengan etanol 70% sampai tidak terbentuk lapisan minyak)
- Ditetesi dengan larutan H_2O_2 3 %
- Diamati pembentukan gelembung udara (positif) yang terjadi pada koloni dan sekitarnya. Terbentuknya gelembung gas menandai bahwa bakteri tersebut bersifat aerobik (uji katalase tersebut positif)

Hasil

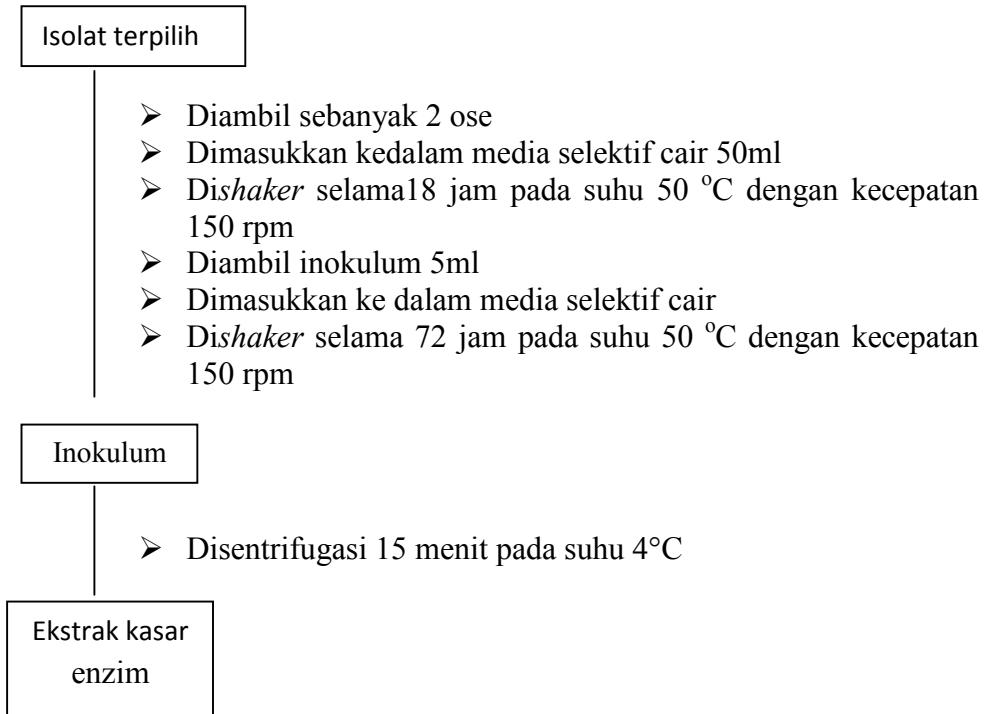
- **Uji endospora**

Isolat (3 Hari)

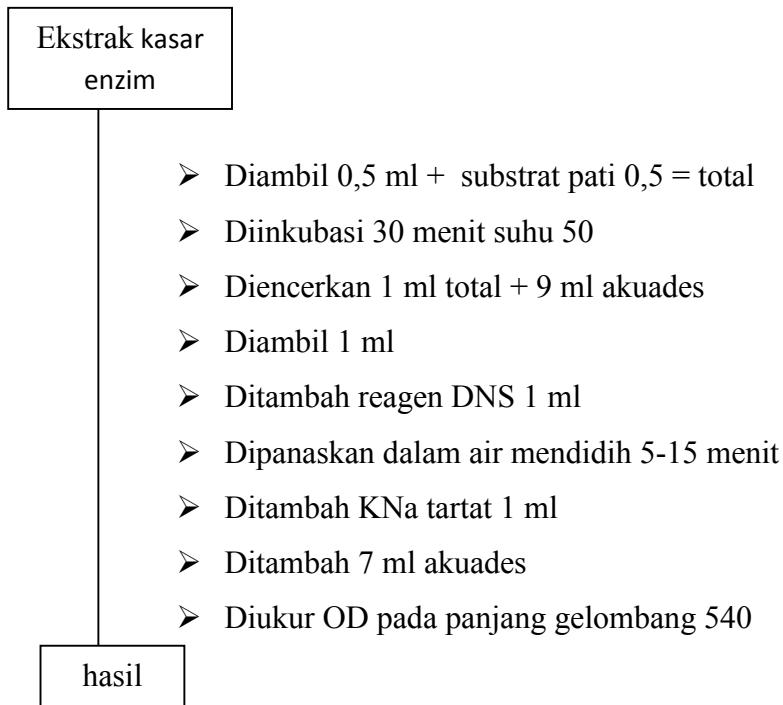
- Diambil sedikit secara aseptis dengan menggunakan jarum oose
- Disuspensikan dengan aquades steril yang ada di gelas obyek
- Difiksasi di atas api bunsen.
- Ditetesi dengan *Malachit green*.
- Diletakkan diatas kawat yang sudah dipanaskan diatas air mendidih selama 10 menit.
- Dicuci dengan hati-hati dengan air mengalir.
- Ditetesi dengan menggunakan safranin
- Didiamkan selama 30 detik
- Dicuci menggunakan air mengalir
- Dikeringkan dengan hati-hati
- Diamati dengan mikroskop (uji positif jika sel vegetatif berwarna merah dan spora berwarna hijau)

Hasil

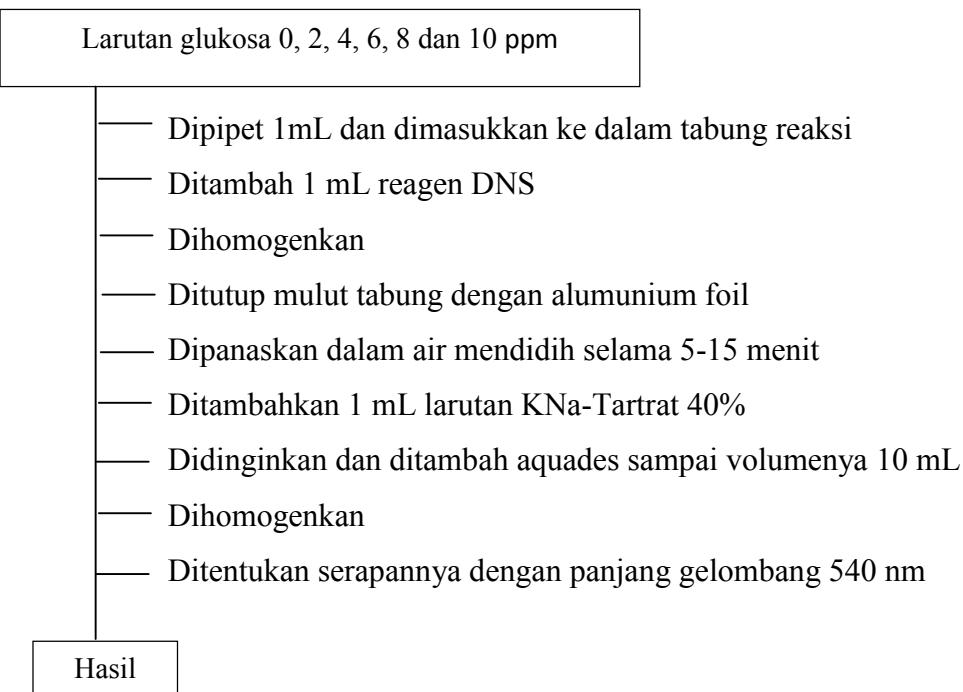
4. Pembuatan Inokulum dan Produksi Enzim Amilase Kasar



5. Uji Aktivitas Enzim Amilase



6. Pembuatan Kurva Standar Glukosa



Lampiran 2. Pembuatan regen

1. Pembuatan Larutan Standart Glukosa

Cara membuat larutan stok glukosa standart 5000 ppm adalah :

$$5000 \text{ ppm} = \frac{5000 \text{ mg}}{1 \text{ L}} = \frac{5 \text{ g}}{1 \text{ L}} = \frac{0,5 \text{ g}}{100 \text{ mL}}$$

Untuk membuat larutan standart 5000 ppm diperlukan 0,5 g glukosa, dilarutkan dengan aquades sebanyak 100 mL. Kemudian larutan glukosa dengan konsentrasi 0, 200,400, 600, 800, 1000 ppm sebanyak 100 mL dibuat sesuai dengan menggunakan rumus pengenceran sebagaimana berikut :

- a. Konsentrasi 200 ppm

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 5000 \text{ ppm} = 100 \times 200 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 4 \text{ mL}$$

b. Konsentrasi 400 ppm

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 5000 \text{ ppm} = 100 \times 400 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 8 \text{ mL}$$

c. Konsentrasi 600 ppm

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 5000 \text{ ppm} = 100 \times 600 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 12 \text{ mL}$$

d. Konsentrasi 800 ppm

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 5000 \text{ ppm} = 100 \times 800 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 16 \text{ mL}$$

e. Konsentrasi 1000 ppm

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 5000 \text{ ppm} = 100 \times 1000 \text{ ppm}$$

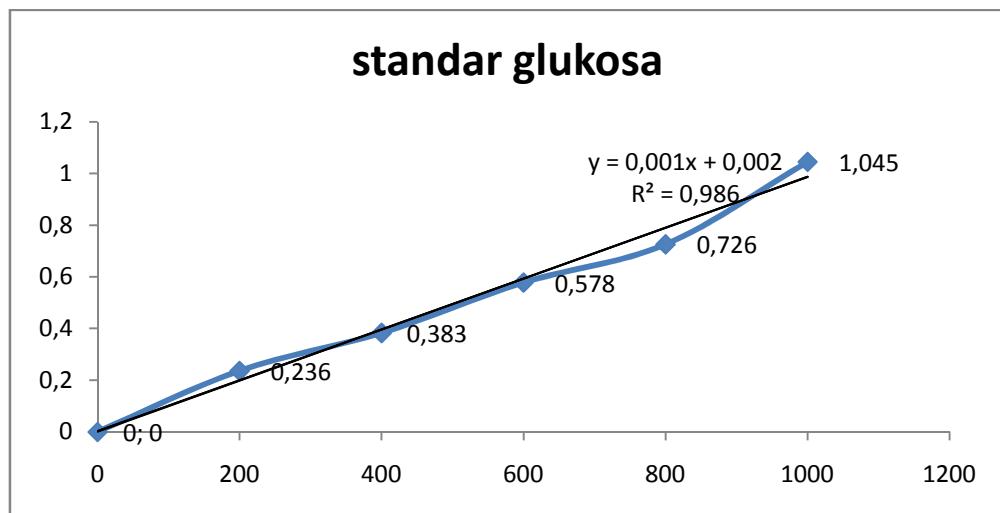
$$V_1 = 20 \text{ mL}$$

2. Kurva Standar Larutan Glukosa

- Data Absorbansi Larutan Glukosa Pada λ 540 nm

Konsentrasi Glukosa (ppm)	Absorbansi
Blanko	0
200	0,236
400	0,383
600	0,578
800	0,726
1000	1,045

- Gambar Grafik Kurva Standar Glukosa



3. Nilai Absorbansi Ekstrak Kasar Amilase

Kode	Absorbansi
Blanko	0
A1 (1)	0,125
A1 (2)	0,062
A1 (3)	0,016
A3 (1)	0,216
A3 (2)	0,202
A3 (3)	0,282
A5 (1)	0,553
A5 (2)	0,286
A5 (3)	0,516

4. Hasil perhitungan uji aktifitas enzim

Untuk menentukan aktivitas ekstrak kasar amilase dapat diketahui dengan menggunakan persamaan:

$$\text{Unit Aktivitas} = \frac{C}{BM \text{produk} \times t} \times \frac{H}{E}$$

Dimana:

C = Konsentrasi gula reduksi (ppm)

BM = Berat molekul glukosa

t = Waktu inkubasi (menit)

H = Volume enzim-substrat (mL)

E = Volume enzim (mL)

a. Isolat A1(1)

Diket : $Y = 0,001x + 0,0025$

$$Y = 0,125$$

Ditanya: x (konsentrasi glukosa) ?

AE (aktifitas enzim) ?

Jawab: $Y = 0,001x + 0,0025$

$$0,125 = 0,001x + 0,0025$$

$$X = (0,125 - 0,0025) / 0,001$$

$$= 122,5 \text{ ppm}$$

X = 122,5 x faktor pengenceran

$$X = 122,5 * 10 = 1225 \text{ ppm}$$

$$AE = \frac{C}{BM \text{Glukosa} \times t} \times \frac{H}{E}$$

$$AE = \frac{1225}{180 \times 30} \times \frac{1}{0,5}$$

$$AE = 0,4537 \text{ Unit/ ml}$$

b. Isolat A1(2)

Diket : $Y = 0,001x + 0,0025$

$$Y = 0,062$$

Ditanya: x (konsentrasi glukosa) ?

AE (aktifitas enzim) ?

Jawab: $Y = 0,001x + 0,0025$

$$\begin{aligned}
 0,062 &= 0,001x + 0,0025 \\
 X &= (0,062 - 0,0025) / 0,001 \\
 &= 59,5 \text{ ppm} \\
 X &= 59,5 \times \text{faktor pengenceran} \\
 X &= 59,5 \times 10 = 595 \text{ ppm} \\
 AE &= \frac{C}{BM \text{ Glukosa} \times t} \times \frac{H}{E} \\
 AE &= \frac{595}{180 \times 30} \times \frac{1}{0,5} \\
 AE &= 0,2204 \text{ Unit/ml}
 \end{aligned}$$

c. Isolat A1(3)

$$\begin{aligned}
 \text{Diket : } Y &= 0,001x + 0,0025 \\
 Y &= 0,160 \\
 \text{Ditanya: } x \text{ (konsentrasi glukosa) ?} \\
 \text{AE (aktifitas enzim) ?} \\
 \text{Jawab: } Y &= 0,001x + 0,0025 \\
 0,160 &= 0,001x + 0,0025 \\
 X &= (0,160 - 0,0025) / 0,001 \\
 &= 157,5 \text{ ppm} \\
 X &= 157,5 \times \text{faktor pengenceran} \\
 X &= 157,5 \times 10 = 1575 \text{ ppm} \\
 AE &= \frac{C}{BM \text{ Glukosa} \times t} \times \frac{H}{E} \\
 AE &= \frac{1575}{180 \times 30} \times \frac{1}{0,5} \\
 AE &= 0,583 \text{ Unit/ml}
 \end{aligned}$$

d. Isolat A3(1)

$$\begin{aligned}
 \text{Diket : } Y &= 0,001x + 0,0025 \\
 Y &= 0,216 \\
 \text{Ditanya: } x \text{ (konsentrasi glukosa) ?} \\
 \text{AE (aktifitas enzim) ?} \\
 \text{Jawab: } Y &= 0,001x + 0,0025 \\
 0,216 &= 0,001x + 0,0025 \\
 X &= (0,216 - 0,0025) / 0,001
 \end{aligned}$$

$$= 213,5 \text{ ppm}$$

$X = 213,5 \times \text{faktor pengenceran}$

$$X = 213,5 \times 10 = 2135 \text{ ppm}$$

$$AE = \frac{C}{BM \text{ Glukosa} \times t} \times \frac{H}{E}$$

$$AE = \frac{2135}{180 \times 30} \times \frac{1}{0,5}$$

$$AE = 0,791 \text{ Unit/ml}$$

e. Isolat A3(2)

Diket : $Y = 0,001x + 0,0025$

$$Y = 0,202$$

Ditanya: x (konsentrasi glukosa) ?

AE (aktifitas enzim) ?

Jawab: $Y = 0,001x + 0,0025$

$$0,202 = 0,001x + 0,0025$$

$$X = (0,202 - 0,0025) / 0,001$$

$$= 199,5 \text{ ppm}$$

$X = 199,5 \times \text{faktor pengenceran}$

$$X = 199,5 \times 10 = 1995 \text{ ppm}$$

$$AE = \frac{C}{BM \text{ Glukosa} \times t} \times \frac{H}{E}$$

$$AE = \frac{1995}{180 \times 30} \times \frac{1}{0,5}$$

$$AE = 0,739 \text{ Unit/ml}$$

f. Isolat A3(3)

Diket : $Y = 0,001x + 0,0025$

$$Y = 0,282$$

Ditanya: x (konsentrasi glukosa) ?

AE (aktifitas enzim) ?

Jawab: $Y = 0,001x + 0,0025$

$$0,282 = 0,001x + 0,0025$$

$$X = (0,282 - 0,0025) / 0,001$$

$$= 279,5 \text{ ppm}$$

$$X = 279,5 \times \text{faktor pengenceran}$$

$$X = 279,5 \times 10 = 2795 \text{ ppm}$$

$$AE = \frac{C}{BM \text{ Glukosa} \times t} \times \frac{H}{E}$$

$$AE = \frac{2795}{180 \times 30} \times \frac{1}{0,5}$$

$$AE = 1,035 \text{ Unit/ml}$$

g. Isolat A5(1)

$$\text{Diket : } Y = 0,001x + 0,0025$$

$$Y = 0,553$$

Ditanya: x (konsentrasi glukosa) ?

$$AE (\text{aktifitas enzim}) ?$$

$$\text{Jawab: } Y = 0,001x + 0,0025$$

$$0,553 = 0,001x + 0,0025$$

$$X = (0,553 - 0,0025) / 0,001$$

$$= 550,5 \text{ ppm}$$

$$X = 550,5 \times \text{faktor pengenceran}$$

$$X = 550,5 \times 10 = 5505 \text{ ppm}$$

$$AE = \frac{C}{BM \text{ Glukosa} \times t} \times \frac{H}{E}$$

$$AE = \frac{5505}{180 \times 30} \times \frac{1}{0,5}$$

$$AE = 2,039 \text{ Unit/ml}$$

h. Isolat A5(2)

$$\text{Diket : } Y = 0,001x + 0,0025$$

$$Y = 0,286$$

Ditanya: x (konsentrasi glukosa) ?

$$AE (\text{aktifitas enzim}) ?$$

$$\text{Jawab: } Y = 0,001x + 0,0025$$

$$0,286 = 0,001x + 0,0025$$

$$X = (0,286 - 0,0025) / 0,001$$

$$= 283,5 \text{ ppm}$$

$$X = 283,5 \times \text{faktor pengenceran}$$

$$X = 283,5 \times 10 = 2835 \text{ ppm}$$

$$AE = \frac{C}{BM\ Glukosa \times t} \times \frac{H}{E}$$

$$AE = \frac{2835}{180 \times 30} \times \frac{1}{0,5}$$

$$AE = 1,05 \text{ Unit/ml}$$

i. Isolat A5(3)

$$\text{Diket : } Y = 0,001x + 0,0025$$

$$Y = 0,516$$

Ditanya: x (konsentrasi glukosa) ?

AE (aktifitas enzim) ?

$$\text{Jawab: } Y = 0,001x + 0,0025$$

$$0,516 = 0,001x + 0,0025$$

$$X = (0,516 - 0,0025) / 0,001$$

$$= 513,5 \text{ ppm}$$

X = 513,5 x faktor pengenceran

$$X = 513,5 \times 10 = 5135 \text{ ppm}$$

$$AE = \frac{C}{BM\ Glukosa \times t} \times \frac{H}{E}$$

$$AE = \frac{5135}{180 \times 30} \times \frac{1}{0,5}$$

$$AE = 1,902 \text{ Unit/ml}$$

5. Tabel hasil uji aktifitas enzim amilase

Isolat	Ulangan 1		Ulangan 2		Ulangan 3		Rata-rata
	Konsentrasi (ppm)	Aktivitas (U/mL)	Konsentrasi (ppm)	Aktivitas (U/mL)	Konsentrasi (ppm)	Aktivitas (U/mL)	
A1	1225	0,4537	595	0,2204	1575	0,583	0,419
A3	2135	0,791	1995	0,739	2795	1,035	0,855
A5	5505	2,039	2835	1,05	5135	1,902	1,664

6. Tabel diameter zona bening

No	Kode isolat	DK (mm)	D.total(mm)	DZB(mm)	Rata-rata
1	A1 (1)	40	50	10	13
2	A1 (2)	11	25	14	
3	A1 (3)	15	30	15	
4	A3 (1)	5	12	7	10
5	A3 (2)	14	25	11	
6	A3 (3)	9	21	12	
7	A5 (1)	11	23	12	15
8	A5 (2)	13	30	17	
9	A5 (3)	15	30	15	

Lampiran 3. Dokumentasi

Gambar zona bening



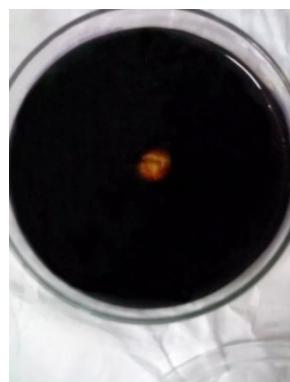
A1



A1(2)



A1(3)



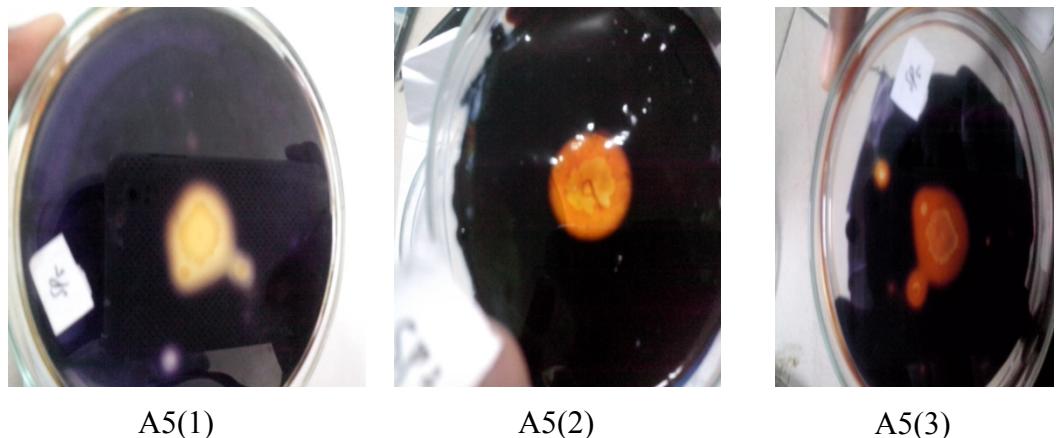
A3(1)



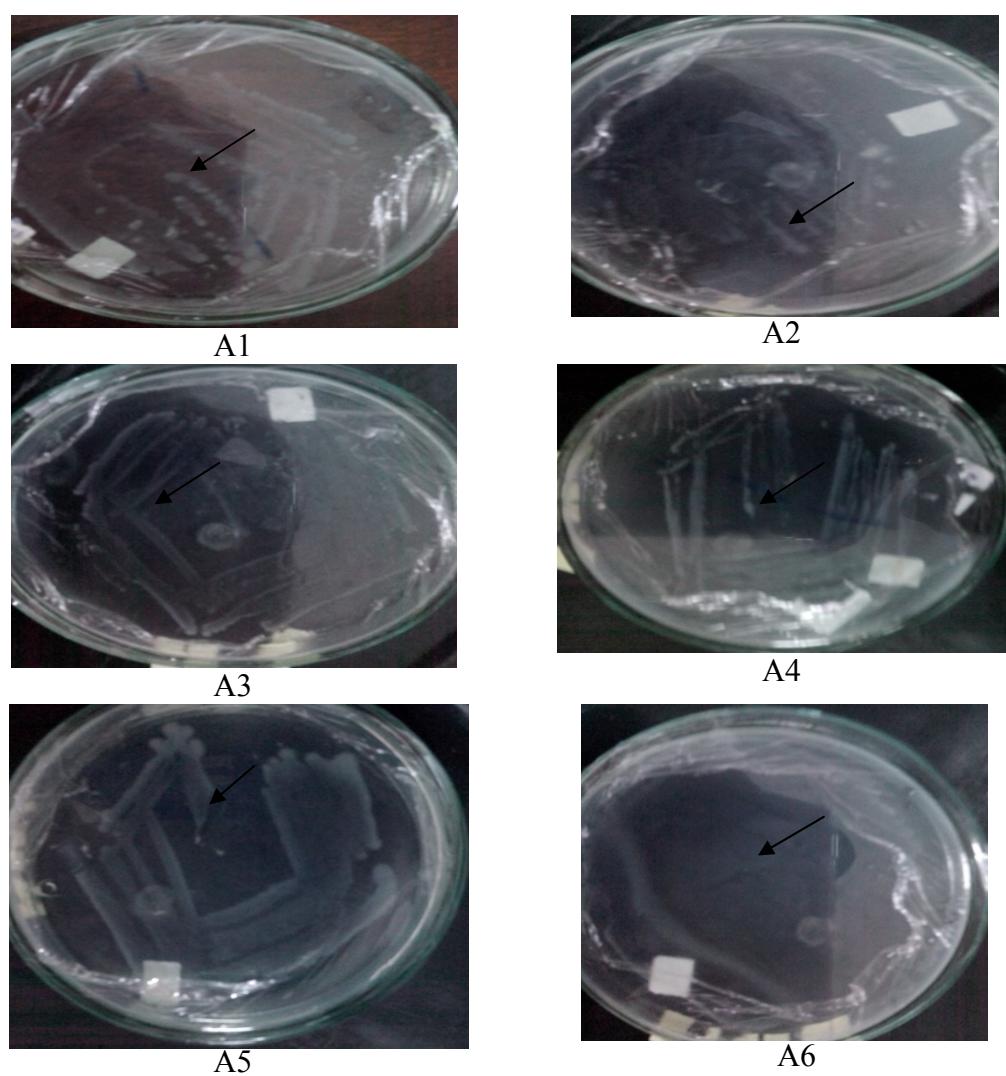
A3(2)

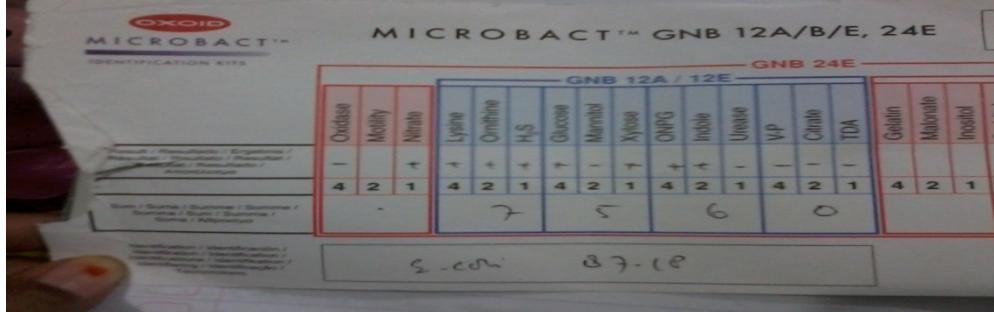


A3(3)



Gambar koloni bakteri



	 <p>Sentrifugasi Ekstrak Kasar Enzim</p>																																																							
	 <p>Larutan enzim+dns+kna tartat+aquades</p>																																																							
	 <p>Sumber air panas</p>																																																							
 <table border="1" data-bbox="661 1696 1283 1876"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Oxidase</th> <th colspan="3">GNB 12A / 12E</th> <th colspan="3">GNB 24E</th> </tr> <tr> <th>Lysine</th> <th>Orotate</th> <th>H2S</th> <th>Gluconate</th> <th>Mannitol</th> <th>Xylose</th> <th>ONPG</th> <th>Inulin</th> <th>Urease</th> <th>V/P</th> <th>Citrate</th> <th>TDA</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>-</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>-</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>4 2 1</td> </tr> <tr> <td>-</td> <td>7</td> <td>5</td> <td>6</td> <td>-</td> <td>0</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> </tbody> </table> <p>Patien record</p>		Oxidase	GNB 12A / 12E			GNB 24E			Lysine	Orotate	H2S	Gluconate	Mannitol	Xylose	ONPG	Inulin	Urease	V/P	Citrate	TDA	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	4 2 1	4 2 1	4 2 1	4 2 1	4 2 1	4 2 1	4 2 1	4 2 1	4 2 1	4 2 1	4 2 1	4 2 1	-	7	5	6	-	0	-	-	-	-	-	-
Oxidase	GNB 12A / 12E			GNB 24E																																																				
	Lysine	Orotate	H2S	Gluconate	Mannitol	Xylose	ONPG	Inulin	Urease	V/P	Citrate	TDA																																												
-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-																																													
4 2 1	4 2 1	4 2 1	4 2 1	4 2 1	4 2 1	4 2 1	4 2 1	4 2 1	4 2 1	4 2 1	4 2 1																																													
-	7	5	6	-	0	-	-	-	-	-	-																																													



**KEMENTERIAN AGAMA RI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JL. Gajayana No. 50 Malang (0341) 558933 Fax. (0341) 558933**

BUKTI KONSULTASI SKRIPSI

Nama	:	Mega Puspita Sari
NIM	:	10620056
Fakultas/ Jurusan	:	Sains dan Teknologi /Biologi
Judul Skripsi	:	Isolasi Bakteri Amilolitik Termofilik dari Sumber Air Panas Pacet Mojokerto dan Pengujian Aktivitas Enzim Amilase
Pembimbing	:	Anik Maunatin, M.P

No.	Tanggal	Perihal	Tanda Tangan
1.	8 Januari 2014	Pengajuan Judul Skripsi	1. <i>M.P</i>
2.	22 Januari 2014	Konsultasi BAB I	2. <i>M.P</i>
3.	3 Februari 2014	Revisi BAB I	3. <i>M.P</i>
4.	10 Februari 2014	ACC BAB I	4. <i>M.P</i>
5.	3 Maret 2014	Konsultasi BAB II, III	5. <i>M.P</i>
6.	10 Maret 2014	Revisi BAB II,III	6. <i>M.P</i>
7.	19 Maret 2014	Revisi BAB II, III	7. <i>M.P</i>
8.	28 Maret 2014	ACC BAB II, III	8. <i>M.P</i>
9.	24 September 2014	Konsultasi BAB IV	9. <i>M.P</i>
10.	29 September 2014	Revisi BAB IV	10. <i>M.P</i>
11.	2 Oktober 2014	Revisi BAB IV	11. <i>M.P</i>
12.	13 Oktober 2014	ACC Skripsi	12. <i>M.P</i>
13.	7 November 2014	ACC Keseluruhan	13. <i>M.P</i>

Malang, 04 Desember 2014

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi



D.Evika Sandi Savitri, M.P
NIP. 19741018 200312 2 002



KEMENTERIAN AGAMA RI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JL. Gajayana No. 50 Malang (0341) 558933 Fax. (0341) 558933

BUKTI KONSULTASI AGAMA

Nama	:	Mega Puspita Sari
NIM	:	10620056
Fakultas/ Jurusan	:	Sains dan Teknologi /Biologi
Judul Skripsi	:	Isolasi Bakteri Amilolitik Termofilik dari Sumber Air Panas Pacet Mojokerto dan Pengujian Aktivitas Enzim Amilase
Pembimbing	:	Mujahidin Ahmad, M.Sc

No.	Tanggal	Perihal	Tanda Tangan
1.	3 Maret 2014	Konsultasi BAB I,II, III	1.
2.	12 Maret 2014	Revisi BAB I,II,III	2.
3.	24 Maret 2014	ACC BAB I,II,III	3.
4.	29 September 2014	Konsultasi BAB IV	4.
5.	6 Oktober 2014	Revisi BAB IV	5.
6.	20 Oktober 2014	ACC Skripsi	6.
7.	7 November 2014	ACC Keseluruhan	7.

Malang, 04 Desember 2014

Mengetahui,

Ketua Jurusan Biologi



Dr. Evika Sandi Savitri, M.P

NIP. 19741018 200312 2 002