

Lampiran 1. Prosedur Kerja

L.1.1 Pembuatan Media

Nutrient Agar

- ditimbang sebanyak 20 gram dan dimasukkan dalam erlenmeyer 1000 ml
- dilarutkandengan aquades 1000 ml
- dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk hingga larut
- ditutup dengan kapas
- disterilisasi dalam aotuklaf pada suhu 121 °C, tekanan 1 atm selama 15 menit

Media Nutrient Agar

Potato Dekstrose Agar

- ditimbang sebanyak 39 gram dan dimasukkan dalam erlenmeyer 1000 ml
- dilarutkandengan aquades 1000 ml
- dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk hingga larut
- ditutup dengan kapas
- disterilisasi dalam aotuklaf pada suhu 121 °C, tekanan 1 atm selama 15 menit

Media Potato Dekstore Agar

L.1.2 Pembuatan Koloidal Kitin

Bubuk kitin

- ditimbang sebanyak 10 gram dan dimasukkan dalam erlenmeyer 1000 ml
- dilarutkan dengan 200 ml HCl pekat
- distirer selama 2 jam
- diinkubasi selama 24 jam pada suhu 4°C
- disaring menggunakan glass wool
- filtrat hasil penyaringan ditambah 100 ml aquades
- dinetralkan dengan NaOH 12 N
- disentrifugasi kecepatan 8000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C
- dibuang supernatan, pelet ditambah dengan aquades
- disentrifugasi kecepatan 8000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C
- dibuang supernatan

Koloidal kitin

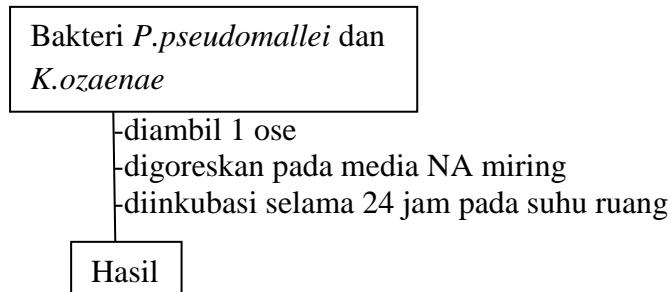
L.1.3 Pembuatan Media Cair Kitin

Koloidal kitin 1 gram, pepton 0,1 gram, KH₂PO₄ 0,1 gram, MgSO₄.H₂O 0,05 gram.

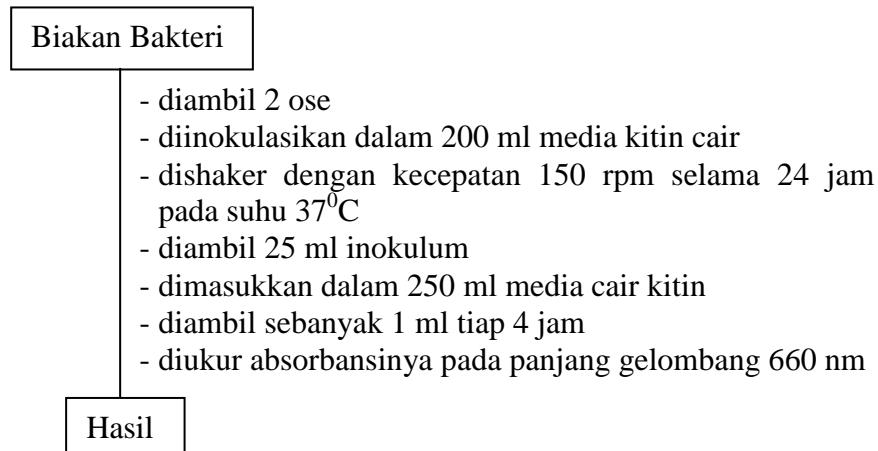
- dimasukkan dalam enlenmeyer 250 mL
- dilarutkan dengan aquades 100 mL
- dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk hingga larut
- ditutup dengan kapas
- disterilisasi dalam aotuklaf pada suhu 121 °C, tekanan 1 atm selama 15 menit

Media kitin cair 1 %

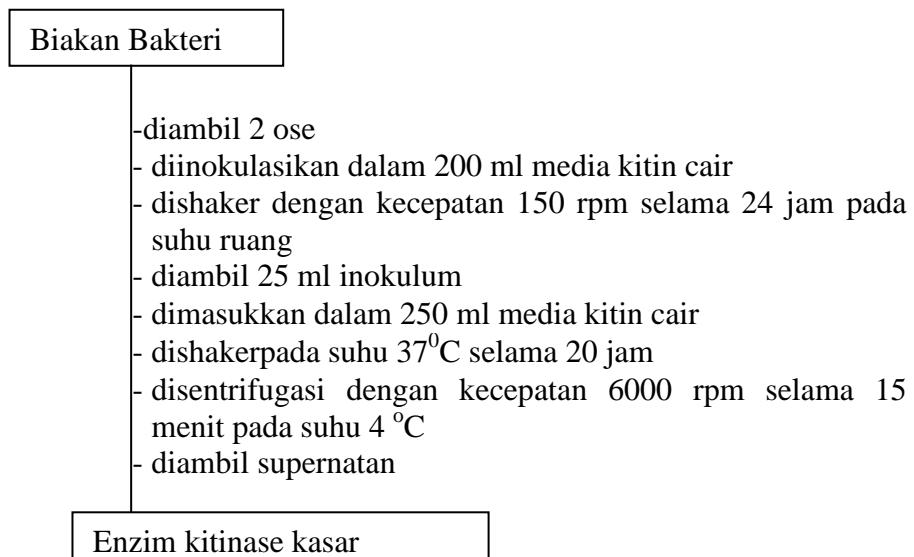
L.1.4 Peremajaan Bakteri *P.pseudomallei* dan *K.ozaenae*



L.1.5 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri



L.1.6 Produksi Enzim Kitinase Kasar dari *P.pseudomallei* dan *K.ozaenae*



L.1.7 Pengukuran Kadar N-asetilglukosamin *F.oxysporum* dengan Metode Miller (1959)

L.1.7.1 Penentuan Panjang Gelombang Optimum pada Glukosa

Glukosa anhidrat 1000 ppm

- dipipet 1 ml dan dimasukkan dalam tabung reaksi
- ditambahkan 2 ml reagen DNS
- ditambah 1 ml K-Na-tartrat 4% setelah terbentuk kompleks warna
- ditutup mulut tabung dengan alumunium foil
- dimasukkan tabung dalam air mendidih selama 15 menit
- diencerkan dengan 20 ml aquades
- diukur absorbansinya pada panjang gelombang 520-550 nm

Panjang gelombang optimum

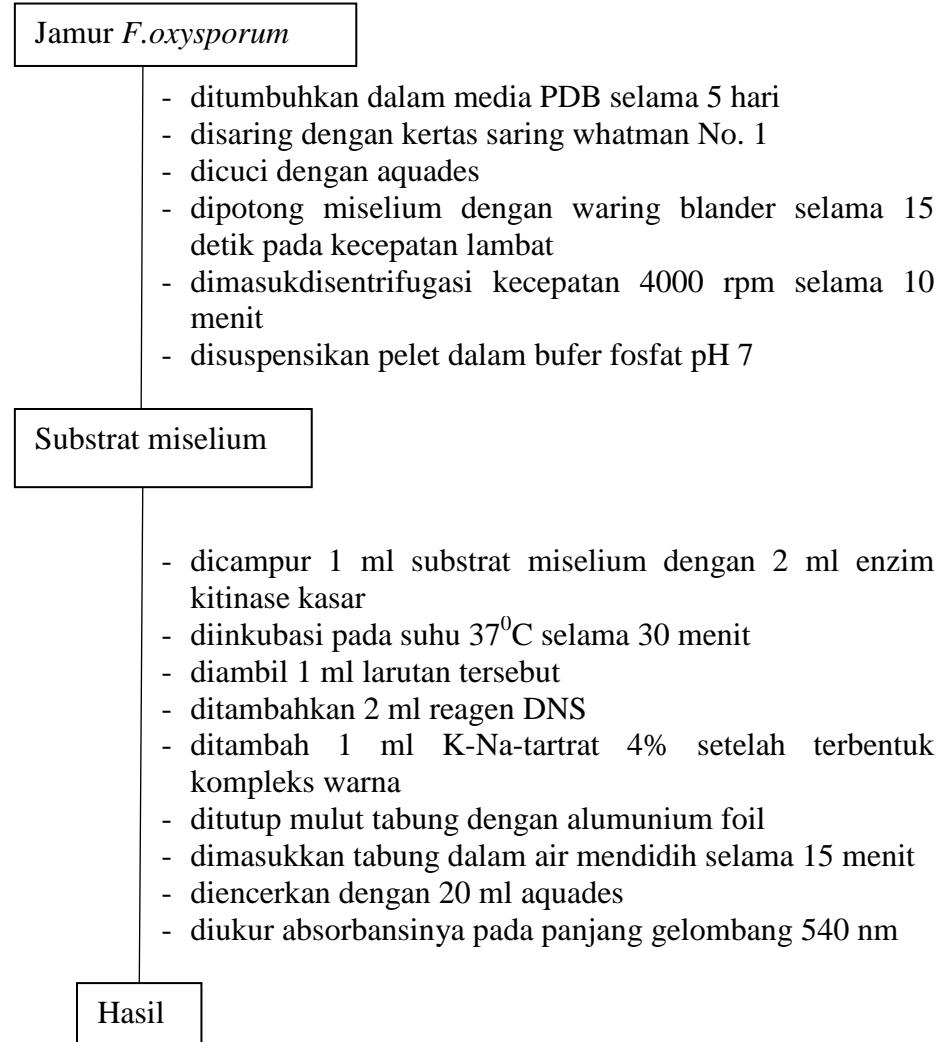
L.1.7.2 Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Glukosa anhidrat

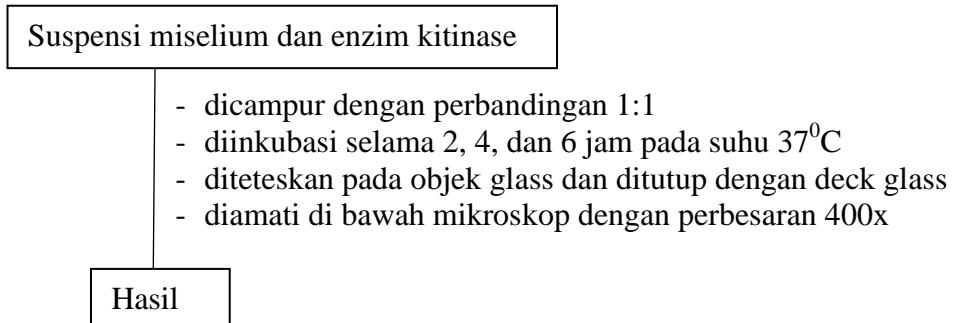
- ditimbang sebanyak 1000 mg
- dilarutkan dalam 1000 mL aquades
- diencerkan hingga didapatkan larutan dengan konsentrasi 200, 400, 600, 800 dan 1000 ppm
- dipipet masing-masing sebanyak 1 ml
- dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berbeda
- ditambah 2 ml reagen DNS
- ditambah 1 ml K-Na-tartrat 4% setelah terbentuk kompleks warna
- ditutup mulut tabung dengan alumunium foil
- dimasukkan tabung dalam air mendidih selama 15 menit
- diencerkan dengan 20 ml aquades
- diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm

Kurva Standart

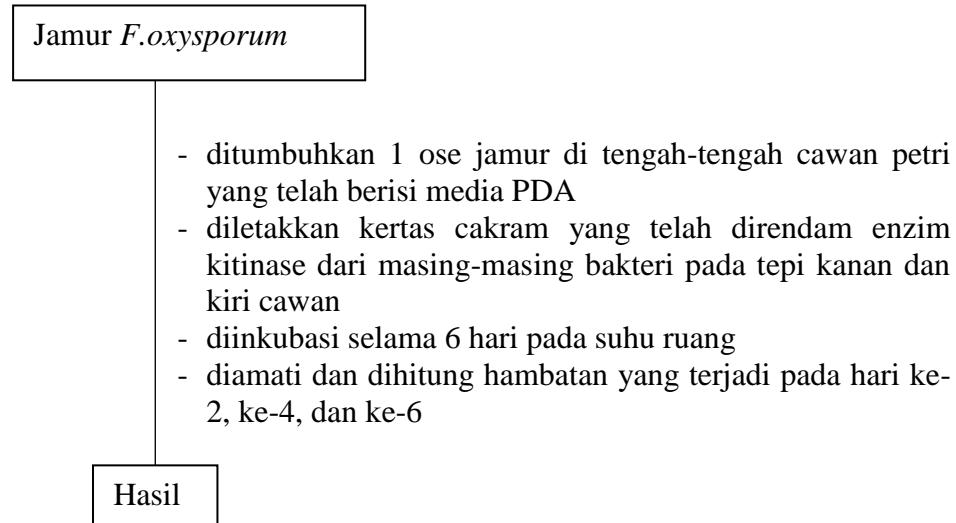
L.1.7.3 Pengukuran Kadar N-asetilglukosamin *F.oxysporum*



L.1.8 Pengamatan Morfologi Miselium *F.oxysporum*



L.1.9 Uji kemampuan Antijamur Enzim Kitinase terhadap *F.oxysporum*



Lampiran 2. Pembuatan Reagen

L.2.1 Pembuatan Reagen DNS Modifikasi (Rahmansyah, 2003)

DNS sebanyak 1 gram dilarutkan dalam 50 ml aquades di dalam labu ukur 100 ml. Kemudian ditambahkan 12,5 ml NaOH 2N, 10 ml NaSO₃, 10 ml fenol 2% dan ditera. Sebanyak 1 ml garam Rochelle 4% ditambahkan setelah terbentuk kompleks warna antara DNS dan gula pereduksi hasil hidrolisis.

L.2.2 Pembuatan Larutan Stok Glukosa (Saropah, 2012)

Cara membuat larutan stok glukosa standart 1000 ppm adalah (Saropah, 2012):

$$\text{ppm} = \frac{\text{mg}}{\text{L}}, \text{ maka } 1000 \text{ ppm} = \frac{1000 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} = \frac{100 \text{ mg}}{100 \text{ ml}}$$

Sehingga untuk membuat larutan standart 1000 ppm sebanyak 100 ml diperlukan 100 mg glukosa anhidrat, dilarutkan dengan aquades dan ditandabataskan dalam labu takar 100 ml. Larutan glukosa standart dengan konsentrasi 200, 400, 600, 800, dan 1000 ppm diperoleh dengan pengenceran larutan stok:

- a. Konsentrasi 200 ppm

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

$$200 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml} = 1000 \text{ ppm} \times V_2$$

$$V_2 = \frac{200 \times 10}{1000}$$

$$V_2 = 2 \text{ mL}$$

- b. Konsentrasi 400 ppm

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

$$400 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml} = 1000 \text{ ppm} \times V_2$$

$$V_2 = \frac{400 \times 10}{1000}$$

$$V_2 = 4 \text{ ml}$$

c. Konsentrasi 50 ppm

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

$$600 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml} = 100 \text{ ppm} \times V_2$$

$$V_2 = \frac{600 \times 10}{1000}$$

$$V_2 = 6 \text{ ml}$$

d. Konsentrasi 800 ppm

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

$$800 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml} = 100 \times V_2$$

$$V_2 = \frac{800 \times 10}{1000}$$

$$V_2 = 8 \text{ ml}$$

e. Konsentrasi 1000 ppm

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

$$1000 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml} = 100 \times V_2$$

$$V_2 = \frac{1000 \times 10}{1000}$$

$$V_2 = 10 \text{ ml}$$

Lampiran 3. Kurva Pertumbuhan Bakteri *P.pseudomallei*, *K.ozaenae*, Serta Kombinasi (*P.pseudomallei* + *K.ozaenae*)

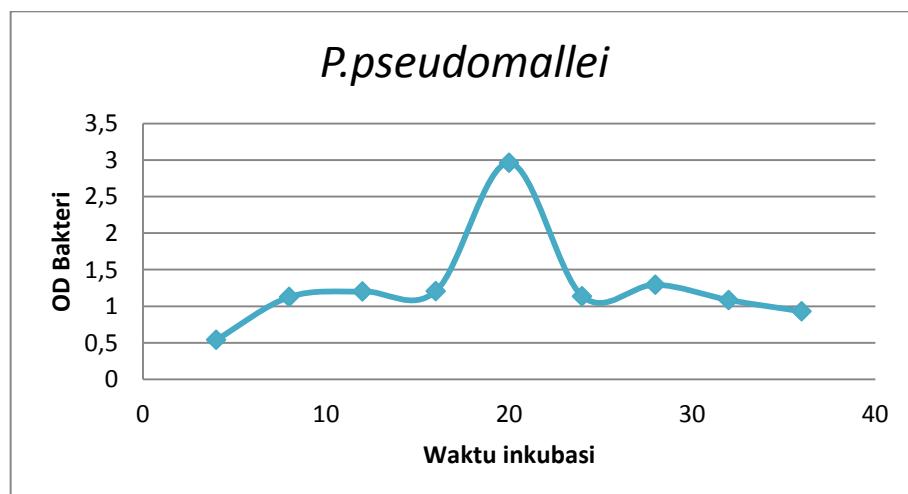
L.3.1 Data Pertumbuhan Bakteri

Tabel L.3.1 Data Hasil Absorbansi

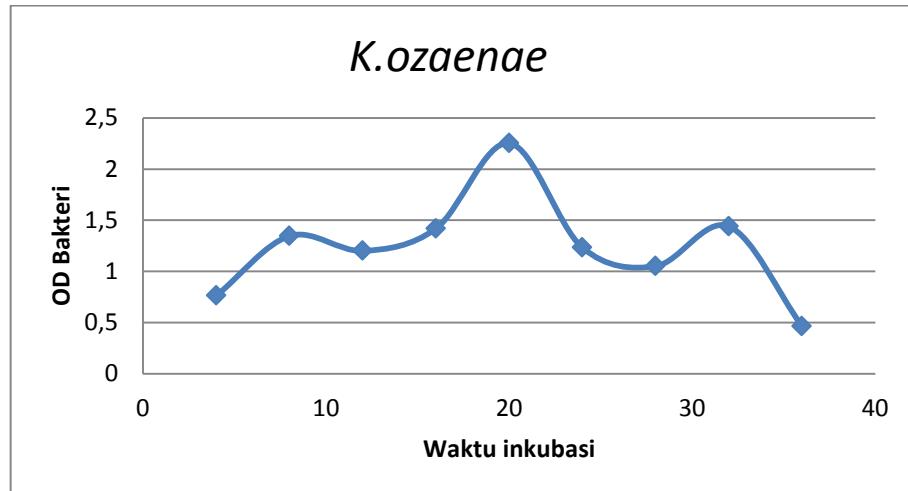
Waktu inkubasi (jam)	Absorbansi		
	<i>P.pseudomallei</i>	<i>K.ozaenae</i>	<i>P.pseudomallei</i> + <i>K.ozaenae</i>
4	0,541	0,763	0,204
8	1,127	1,346	1,275
12	1,203	1,201	0,965
16	1,208	1,149	1,049
20	2,962	2,524	2,578
24	1,136	1,233	1,144
28	1,294	1,051	0,872
32	1,085	1,440	1,109
36	0,929	0,465	0,587

L.3.2 Kurva Pertumbuhan Bakteri

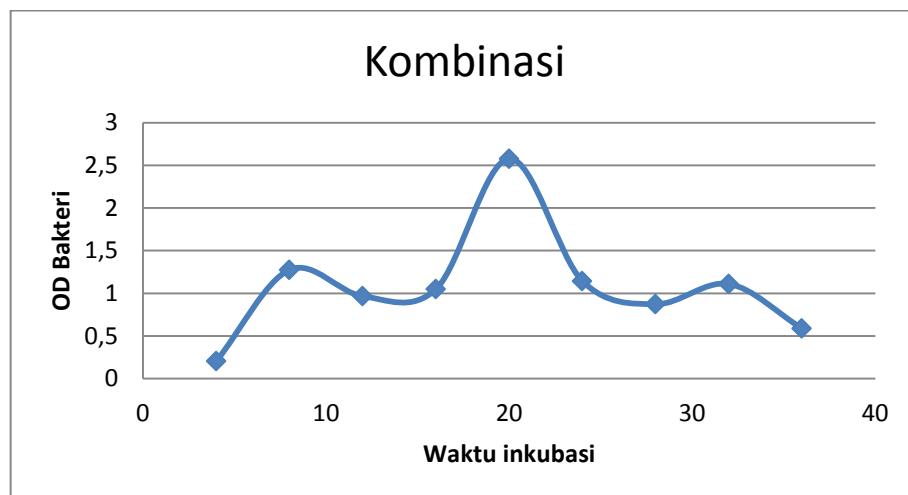
L.3.2.1 Bakteri *P.pseudomallei*



L.3.2.2 Bakteri *K.ozaenae*



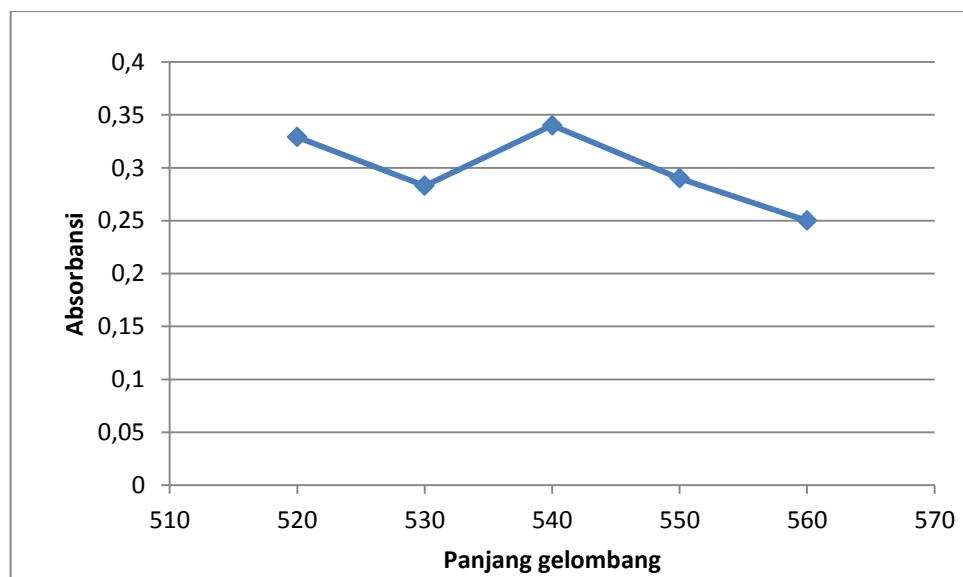
L.3.2.3 Bakteri Kombinasi (*P.pseudomallei* + *K.ozaenae*)



Lampiran 4. Penentuan Panjang Gelombang Optimum pada Glukosa**Tabel L.4.1 Penentuan Panjang Gelombang Optimum**

Tabel L.4.1 Data Hasil Absorbansi

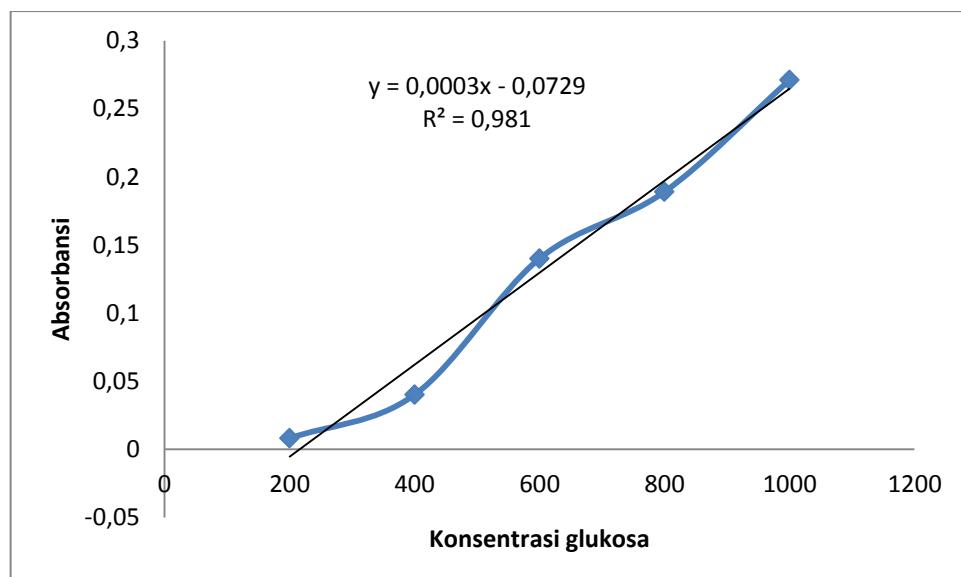
Panjang Gelombang (nm)	Absorbansi
520	0,329
530	0,283
540	0,340
550	0,290
560	0,250

L.4.2 Gambar Penentuan Panjang Gelombang Optimum

Lampiran 5. Kurva Standar Glukosa**L.5.1 Absorbansi Glukosa pada Panjang Gelombang 540 nm**

Tabel L.5.1 Data Hasil Absorbansi

Konsentrasi Glukosa (ppm)	Absorbansi
0	0
200	0,008
400	0,040
600	0,140
1000	0,271

L.5.2 Gambar Kurva Standar Glukosa

Lampiran 6. Perhitungan Kadar N-asetilglukosamin *F.oxysporum*

Contoh: Perhitungan kadar N-asetilglukosamin hasil hidrolisis enzim kitinase dari bakteri *P.pseudomallei* dengan absorbansi 0,018.

Diketahui persamaan kurva standar glukosa adalah sebagai berikut:

$$y = 0,0003x - 0,0729$$

$$0,018 = 0,0003x - 0,0729$$

$$x = 0,018 + 0,0729$$

$$x = 303$$

Nilai x merupakan jumlah konsentrasi N-asetilglukosamin ($\mu\text{g/ml}$) jamur *F.oxysporum* hasil hidrolisis enzim kitinase.

Lampiran 7. Pengaruh Enzim Kitinase Kasar terhadap Kadar N-asetilglukosamin *F.oxysporum*

L.7.1 Data Hasil Absorbansi

Tabel L.7.1 Pengaruh Enzim Kitinase Kasar terhadap Absorbansi Glukosa

Perlakuan	Absorbansi						Rata-rata	
	Ulangan							
	1	2	3	4	5	6		
<i>P.pseudomallei</i>	0,018	0,053	0,016	0,128	0,013	0,029	0,257	
<i>K.ozaenae</i>	0,059	0,039	0,063	0,025	0,109	0,141	0,336	
Kombinasi	0,011	0,014	0,021	0,008	0,021	0,041	0,116	
Kontrol	0,015	0,018	0,014	0,009	0,008	0,025	0,089	

L.7.2 Data Kadar N-asetilglukosamin

Tabel L.7.2 Pengaruh Enzim Kitinase Kasar terhadap Kadar N-asetilglukosamin

Perlakuan	Kadar N-asetilglukosamin ($\mu\text{g/ml}$)						Rata-rata	
	Ulangan							
	1	2	3	4	5	6		
<i>P.pseudomallei</i>	303	419,67	296,67	669,67	286,33	339,67	385,78	
<i>K.ozaenae</i>	439,67	373	453	326,33	606,33	379,67	429,67	
Kombinasi	279,67	289,67	313	269,67	313	379,67	307,44	
Kontrol	293	303	289,67	273	269,67	326,33	292,44	

Lampiran 8. Pengaruh Enzim Kitinase Kasar terhadap Pertumbuhan *F.oxysporum*

L.8.1 Pengukuran Zona Hambat

Tabel L.8.1 Data pengukuran zona hambat

Perlakuan	Ulangan	Zona hambat hari ke-								
		2			4			6		
		X	Y	$\frac{y-x}{2}$	X	Y	$\frac{y-x}{2}$	X	Y	$\frac{y-x}{2}$
<i>P.pseudomallei</i>	1	19	22	1,5	28	32	2	28	32	2
	2	20	18	-1	28	39	5,5	31	61	15
	3	18	19	0,5	30	39	4,5	28	62	17
	4	15	17	1	27	36	4,5	27	51	12
	5	14	16	1	30	37	3,5	32	58	13
	6	21	18	-1,5	31	38	3,5	34	60	13
Rata-rata				0,25			3,91			12
<i>K.ozaenae</i>	1	18	18	0	37	40	1,5	38	39	0,5
	2	27	19	-4	34	32	-1	35	32	-1,5
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	20	20	0	29	36	3,5	30	48	9
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	18	20	1	28	42	7	30	63	16,5
Rata-rata				-0,5			1,83			4,08
Kombinasi	1	14	14	0	31	31	0	32	34	1
	2	4	10	3	25	33	4	28	37	4,5
	3	19	19	0	27	39	6	30	59	14,5
	4	24	26	1	34	42	4	35	64	14,5
	5	21	24	1,5	37	47	5	40	62	11
	6	19	19	0	35	38	1,5	36	55	9,5
Rata-rata				0,91			3,41			9,17
Kontrol	1	19	20	0,5	40	41	0,5	61	61	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	18	18	0	32	40	4	50	61	5,5
	4	17	16	-0,5	32	33	0,5	45	42	-1,5
	5	18	18	0	43	40	-1,5	66	57	-4,5
	6	20	21	0,5	59	42	-8,5	71	58	-6,5
Rata-rata				0,08			-0,8			-1,17

Lampiran 9. Analisis ANOVA Pengaruh Enzim Kitinase Terhadap Pertumbuhan *F.oxysporum*

L.9.1 Analisis ANOVA Oneway Hari ke-2

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		data
N		24
Normal Parameters ^a	Mean	.1875
	Std. Deviation	1.26674
Most Extreme Differences	Absolute	.274
	Positive	.142
	Negative	-.274
Kolmogorov-Smirnov Z		1.345
Asymp. Sig. (2-tailed)		.054
a. Test distribution is Normal.		

Oneway

ANOVA

data	ANOVA				
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6.115	3	2.038	1.324	.295
Within Groups	30.792	20	1.540		
Total	36.906	23			

Homogeneous Subsets

data

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	
Duncan ^a			
1	6	-.5000	
4	6	.0833	
3	6	.2500	
2	6	.9167	
Sig.		.083	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

L.9.2 Analisis ANOVA Oneway Hari Ke-4

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		data
N		24
Normal Parameters ^a	Mean	2.0833
	Std. Deviation	3.26931
Most Extreme Differences	Absolute	.168
	Positive	.074
	Negative	-.168
Kolmogorov-Smirnov Z		.821
Asymp. Sig. (2-tailed)		.510
a. Test distribution is Normal.		

Oneway

ANOVA

data	ANOVA				
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	82.250	3	27.417	3.352	.039
Within Groups	163.583	20	8.179		
Total	245.833	23			

Homogeneous Subsets

data

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Duncan ^a			
4	6	-.8333	
2	6	1.8333	1.8333
3	6		3.4167
1	6		3.9167
Sig.		.122	.247

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

L.9.3 Analisis ANOVA Oneway Hari Ke-6

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		data
N		24
Normal Parameters ^a	Mean	6.0208
	Std. Deviation	7.32399
Most Extreme Differences	Absolute	.170
	Positive	.170
	Negative	-.127
Kolmogorov-Smirnov Z		.834
Asymp. Sig. (2-tailed)		.491
a. Test distribution is Normal.		

Oneway

ANOVA

data	ANOVA				
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	606.365	3	202.122	6.443	.003
Within Groups	627.375	20	31.369		
Total	1233.740	23			

Homogeneous Subsets

data

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Duncan ^a				
4	6	-1.1667		
2	6	4.0833	4.0833	
3	6		9.1667	9.1667
1	6			12.0000
Sig.		.120	.132	.391

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

Lampiran 10. Analisis ANOVA Pengaruh Enzim Kitinase Terhadap Kadar N-asetilglukosamin *Fusarium oxysporum*

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		data
N		24
Normal Parameters ^a	Mean	3.5383E2
	Std. Deviation	1.02779E2
Most Extreme Differences	Absolute	.230
	Positive	.230
	Negative	-.206
Kolmogorov-Smirnov Z		1.129
Asymp. Sig. (2-tailed)		.156

a. Test distribution is Normal.

Oneway

ANOVA

data	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	76148.567	3	25382.856	3.043	.053
Within Groups	166812.956	20	8340.648		
Total	242961.522	23			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

data

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Duncan ^a	4	292.4450	
	3	307.4467	
	1	385.7783	385.7783
	2		429.6667
	Sig.	.108	.415

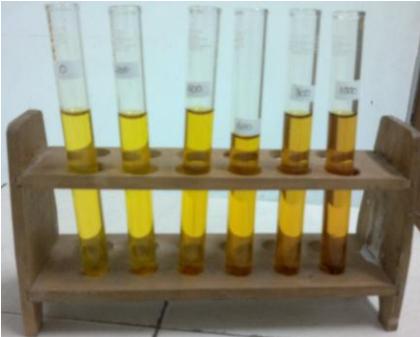
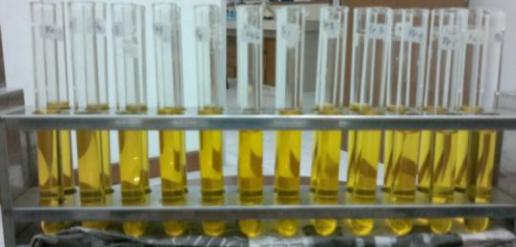
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

Lampiran 11. Gambar Penelitian

	
AUTOKLAF	LAMINAR AIR FLOW
	
INKUBATOR SHAKER	INKUBATOR
	
OVEN	VORTEX

	
	
	
<p>HOT PLATE</p>	<p>SPEKTROFOTOMETER</p>

 <p>pH METER</p>	 <p>TIMBANGAN ANALITIK</p>
 <p>JANGAN LUPA BERSIHKAN MEJA PENELITIAN SETIAP SELESAI BERPENGAM</p> <p>PEMANASAN GLUKOSA UNTUK PEMBUATAN KURVA STANDAR</p>	 <p>PEMANASAN SAMPEL</p>
 <p>GLUKOSA SETELAH DIENCERKAN DENGAN AQUADES</p>	 <p>SAMPEL SETELAH DIENCERKAN DENGAN AQUADES</p>

	 <p>MEDIA PDB</p> <p><i>F.oxysporum</i> DALAM MEDIA PDB</p>
 <p>UJI ANTIJAMUR ENZIM KITINASE TERHADAP <i>F.oxysporum</i></p>	 <p>UJI KADAR N-ASETILGLUKOSAMIN</p>