

**PENENTUAN SPESIFISITAS SUBSTRAT ENZIM SELULASE
DARI BAKTERI *Bacillus subtilis* SF01 DENGAN METODE
KLT- DENSITOMETRI**



THERESIA ANGGRAENI WEDO

2443013223

**PROGRAM STUDI S1
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS KATOLIK WIDYA MANDALA SURABAYA
2017**

**PENENTUAN SPESIFISITAS SUBSTRAT ENZIM SELULASE DARI
BAKTERI *Bacillus subtilis* SF01 DENGAN METODE
KLT-DENSITOMETRI**

SKRIPSI

Diajukan untuk memenuhi sebagian persyaratan
memperoleh gelar Sarjana Farmasi Program Studi Strata 1
di Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya

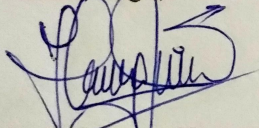
OLEH:

THERESIA ANGGRAENI WEDO

2443013223

Telah disetujui pada tanggal 19 Desember 2017 dan dinyatakan **LULUS**

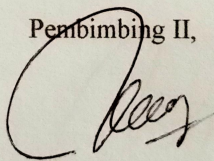
Pembimbing I,



Dr. F. V. Lanny Hartanti, S.Si., M.Si

NIK. 241.00.0437

Pembimbing II,

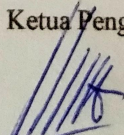


Henry K. Setiawan, S.Si., M.Si., Apt.

NIK. 241.97.0283

Mengetahui

Ketua Penguji,



Prof. Dr. J.S. Ami Soewandi, Apt.

NIK. 241.03.0452

LEMBAR PERSETUJUAN
PUBLIKASI KARYA ILMIAH

Demi perkembangan ilmu pengetahuan saya menyetujui skripsi/ karya ilmiah saya dengan judul : **Penentuan Spesifisitas Substrat Enzim Selulase dari Bakteri *Bacillus subtilis* SF01 dengan Metode KLT-Densitometri** untuk dipublikasikan atau ditampilkan di internet atau media lain, yaitu *Digital Library* Perpustakaan Unika Widya Mandala Surabaya untuk kepentingan akademik sebatas sesuai dengan Undang-Undang Hak Cipta.

Demikian pernyataan persetujuan publikasi karya ilmiah ini

Surabaya, 19 Desember 2017



Theresia Anggraeni Wedo
2443013223

Saya menyatakan dengan sesungguhnya bahwa hasil tugas akhir ini
adalah benar-benar merupakan hasil karya sendiri.
Apabila di kemudian hari diketahui bahwa skripsi ini
merupakan sanksi berupa pembatalan kelulusan
dan atau pencabutan gelar yang saya
peroleh

Surabaya, 19 Desember 2017



Theresia Anggraeni Wedo
2443013223

ABSTRAK

PENENTUAN SPESIFISITAS SUBSTRAT ENZIM SELULASE DARI BAKTERI *Bacillus subtilis* SF01 DENGAN METODE KLT - DENSITOMETRI

Theresia Anggraeni Wedo
2443013223

Bacillus subtilis SF01 adalah bakteri selulolitik yang diisolasi dari ampas tebu. Pengujian penentuan spesifisitas substrat dilakukan dengan Kromatografi Lapis Tipis untuk menentukan jenis selulase (Endo β -1,4-glukanase, Ekso β -1,4-glukanase, β -1,4-glukosidase) dari enzim selulase asal isolat *Bacillus subtilis* SF01. Penelitian ini dilakukan dengan metode KLT menggunakan plat silika gel 60 F₂₅₄, sistem eluen terpilih butanol : asam asetat : air (2:1:1) dan penampak bercak alfa naftol dilanjutkan densitometri. Hasil KLT hidrolisis substrat CMC Na memberikan nilai *R_f* 0,322; 0,395; 0,425 dan avicel PH 101 memberikan nilai *R_f* 0,320; 0,393; 0,420; 0,494 yang lebih rendah daripada nilai *R_f* standar glukosa (0,538), sedangkan nilai *R_f* pada hidrolisis *p*-NPG oleh selulase SF01 memberikan hasil nilai *R_f* 0,761 yang melebihi glukosa. Pengamatan lanjutan menggunakan TLC Scanner 3 pada lintasan ekstrak kasar enzim dan produk hidrolisis CMC Na memberikan hasil adanya spektrum milik produk hidrolisis ekstrak kasar pada substrat.. Simpulan dari data yang diperoleh selulase dari isolat bakteri *Bacillus subtilis* SF01 termasuk enzim Endo β -1,4-glukanase dan Ekso β -1,4-glukanase.

Kata Kunci : enzim selulase, *Bacillus subtilis* SF01, hidrolisis substrat selulase, KLT-Densitometri.

ABSTRACT

DETERMINATION OF SUBSTRATE SPECIFICITY OF CELLULASE ENZYME FROM *Bacillus subtilis* SF01 BY TLC-DENSITOMETRY

Theresia Anggraeni Wedo
2443013223

Bacillus subtilis SF01 is a cellulolytic bacteria which was isolated from cane pulp. Research on determination of substrate specificity of crude extract of cellulase enzyme from *Bacillus Subtilis* SF01 by Thin Layer Chromatography had been done, aim to determine the type of cellulase (Endo β -1,4-glucanase, Exo β -1,4-glucanase, β -1,4-glucosidase) from cellulase enzyme isolated from *Bacillus subtilis* SF01. The method used was Thin Layer Chromatography-Densitometry by using plate silica gel 60 F₂₅₄, and the choosen solvent was butanol : acetat acid : water (2:1:1) and further visualized by alpha naftol. The TLC result of substrate hydrolysis by the enzyme gave the *R_f* values which were 0.322; 0.395; 0.425 and for avicel PH 101 were 0.320; 0.393; 0.420; 0.494 which were lower than glucose standard (0.567), while the *R_f* value of hydrolysis of *p*-NPG was 0.761 (higher than glucose). Further analyzed by TLC Scanner 3 on crude enzyme and product hydrolysis of CMC Na tracks showed result that there were spectrums of product hydrolysis of crude enzyme on substrate. The conclusion of this research is cellulase from *Bacillus subtilis* SF01 is kind of Endo β -1,4-glucanase and Exo β -1,4-glucanase.

Key Words : cellulose enzymes, *Bacillus subtilis* SF01, hydrolysis
cellulase substrate, TLC-Densitometry.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa untuk berkat, perlindungan, rahmat dan kasih karuniaNya, sehingga skripsi dengan judul **“Penentuan Spesifisitas Substrat Enzim Selulase dari Bakteri *Bacillus subtilis* SF01 dengan Metode KLT-Densitometri”** dapat diselesaikan. Penulisan skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk meraih gelar sarjana di Fakultas Farmasi, Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya.

Dalam penulisan ini, banyak tantangan yang dihadapi namun berkat doa, bantuan, bimbingan dan semangat dari berbagai pihak, akhirnya penulis dapat melalui tantangan tersebut. Oleh karena itu diucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada :

1. Tuhan Yesus Kristus dan Bunda Maria yang senantiasa setia menyertai, membimbing dan melindungi dari awal penyusunan hingga terselesaikannya skripsi ini.
2. Keluarga terkasih, Bapak Josafat Placidius, Mama Yuliana Falkonieri Wende Wae, Adik Wilhemus Wedo, Adik Oktavia Natalia Dhen Wedo, Om Yohanis Don Bosco dan Nenek Irminda Dona serta semua keluarga besar atas doa, kasih sayang, perhatian dan perjuangan tiada henti dan luar biasa kepada penulis hingga terselesainya studi strata-I di Fakultas Farmasi .
3. Dr. F.V Lanny Hartanti, S.Si.,M.Si selaku Ketua Program Studi Fakultas Farmasi dan Dosen Pembimbing I serta Henry K. Setiawan, S.Si., M.Si., Apt selaku Dosen Pembimbing II yang telah banyak menyediakan waktu dalam memberikan arahan, bimbingan dan semangat hingga terselesaikannya skripsi ini.

4. Tim Penguji Prof. Dr. J.S. Ami Soewandi, Apt selaku Dosen Penguji I dan Ni Nyoman Purwani, S.Si., M.Si selaku Dosen Penguji II yang telah memberikan saran dan masukan positif yang sangat bermanfaat untuk skripsi ini.
5. Drs. Kuncoro Foe, Ph.D., Apt selaku Rektor Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya, atas kesempatan berharga yang diberikan untuk menempuh pendidikan di Fakultas Farmasi, Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya.
6. Sumi Wijaya, S.Si.,Ph.D., Apt selaku Dekan Fakultas Farmasi sekaligus Penasehat Akademik yang telah menyediakan fasilitas selama berlangsungnya perkuliahan, pengarahan, bimbingan dan dukungan hingga terselesainya studi strata-1 di Fakultas Farmasi, Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya.
7. Terkasih, Yohanes Dambuk, Maria Avita Mite, Ivana Rahayu Latuasan, Tresna Wilberta Loko Demu, Tya Claudia Gandeware, Loucy Feblyn Paty, Inosensia Pajo Situ, Yunni Tungga, Rebeca Reinysarly Mareta Tatibun, Chintya Matondang, Ainun Anugerah, Paulina Ance, Melia Sipa, Monica Emastirinda, Fr. Masawe dan semua teman-teman Farmasi 2013 yang telah memberikan dukungan dan doanya, terimakasih atas segala semangat sehingga dapat terselesaikannya skripsi ini.
8. Sobat-sobat Selulase Angela Lia Christina, Magdalena Eka Putri, Shinta Yasmine yang selalu bersama-sama memberikan dukungan yang positif hingga selesainya penelitian dan penyusunan naskah skripsi ini.
9. Staf dan teman-teman penelitian di Laboratorium Proteomik, Institut Tropical Disease, Universitas Airlangga.
10. Para Dosen untuk setiap pembelajaran ilmu kefarmasian dan ilmu kehidupan, Mbak Tyas, Mbak Evi dan Karyawan lainnya yang

senangtiasa telah memberikan dukungan selama mengerjakan penelitian di laboratorium Kimia Analisis dan Bioanalisis, Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa tidak ada kesempurnaan kecuali milik Tuhan Yang Maha Esa. Akhirnya, tugas akhir yang masih banyak kekurangan ini dipersembahkan kepada alamamater tercinta, Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya dengan harapan semoga bermanfaat.

Surabaya, 13 November 2017

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK.....	i
<i>ABSTRACT</i>	ii
KATA PENGANTAR.....	iii
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
 BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang Penelitian.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Hipotesa Penelitian.....	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	5
 BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Tinjauan tentang Selulase.....	6
2.2 Bakteri Selulolitik <i>Bacillus subtilis</i> SF01.....	7
2.3 Enzim Selulase.....	11
2.3.1 Klasifikasi Enzim Selulase.....	13
2.3.2 Mekanisme Kerja Enzim.....	14
2.3.3 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim...	16
2.4 Tinjauan tentang substrat.....	19
2.4.1 Natrium Karboksimetil Selulosa.....	19
2.4.2 Avicel PH 101.....	20
2.4.3 <i>p</i> -nitrofenil glukopiranosida(<i>p</i> -NPG).....	21

	Halaman
2.5 Spesifisitas Substrat.....	21
2.6 Kromatografi Lapis Tipis.....	22
2.7 Densitometri.....	24
 BAB 3 METODE PENELITIAN	
3.1 Jenis Penelitian.....	25
3.2 Sampel, Bahan dan Alat Penelitian.....	25
3.2.1 Sampel Penelitian.....	25
3.2.2 Bahan Penelitian.....	25
3.2.3 Alat Penelitian.....	26
3.3 Metode Penelitian.....	26
3.3.1 Pembuatan Reagen, Media dan Larutan.....	26
3.3.2 Produksi Ekstrak Kasar Enzim Selulase.....	29
3.3.3 Penentuan Kadar Protein Ekstrak Kasar Enzim Selulase	30
3.3.4 Uji Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim.....	30
3.4 Analisis Data.....	31
3.5 Pengerjaan Kromatografi Lapis Tipis.....	32
3.6 KLT-Densitometer.....	33
3.7 Rancangan Desain Totolan Pada Plat KLT.....	34
3.8 Diagram Alir Penelitian.....	36
 BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Hasil Penelitian.....	37
4.1.1 Kurva Standar Glukosa.....	37
4.1.2 Kurva Standar Protein.....	38
4.1.3 Aktivitas Spesifik Ekstrak Kasar Enzim.....	40
4.1.4 Kromatografi Lapis Tipis.....	40

	Halaman
4.2 Pembahasan.....	48
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan.....	53
5.1 Saran.....	53
DAFTAR PUSTAKA.....	54
LAMPIRAN.....	60

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Hasil BLAST Isolat Bakteri SF01.....	9
4.1 Data Kurva Standar Glukosa.....	37
4.2 Data Kurva Standar Protein.....	38
4.3 Data Kadar Protein Ekstrak Kasar Enzim Selulase <i>Bacillus subtilis</i> SF01	40
4.4 Data Aktivitas Spesifik Ekstrak Kasar Enzim Selulose <i>Basillus subtilis</i> SF01	40
4.5 Nilai <i>R_f</i> Hasil Optimasi Lanjutan Pada Plat Silika Gel 60 F ₂₅₄ Ukuran 10 x 10 cm, Eluen Butanol : Asam Asetat : Air (2:1:1), Pengamatan Pada Lampu UV 254 Dan Penyemprotan Penampak Bercak Alfa Naftol.	42
4.6 Nilai <i>R_f</i> Hasil Optimasi Lanjutan Pada Plat Silika Gel 60 F ₂₅₄ Ukuran 10 x 20 cm, Eluen Butanol : Asam Asetat : Air (2:1:1), Pengamatan Pada Lampu UV 254 Dan Penyemprotan Penampak Bercak Alfa Naftol.	44

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Struktur Selulosa.....	6
2.2 Aktivitas enzim selulase dari isolat <i>Bacillus subtilis</i> SF01 pada berbagai variasi suhu.....	9
2.3 Aktivitas enzim selulase dari isolat <i>Bacillus subtilis</i> SF01 pada berbagai variasi pH.....	9
2.4 Mekanisme hidrolisis selulosa oleh enzim selulase.....	12
2.5 ReaksiEnzimatis.....	14
2.6 Model <i>Lock and Key</i>	15
2.7 Model <i>Induced Fit</i>	16
2.8 Struktur CMC Na.....	19
2.9 Struktur Avicel PH 101.....	20
2.10 Struktur <i>p</i> -NPG.....	20
3.1 Rancangan Desain Totolan Pada Plat KLT.....	34
3.2 Diagram Alir Penelitian.....	36
4.1 Grafik kurva standar glukosa.....	37
4.2 Grafik kurva standar protein.....	39
4.3 Pengamatan hasil eluasi menggunakan plat silika gel 60 F ₂₅₄ ukuran 5 x 10 cm, eluen campuran (1) etil asetat: air :metanol (40:15:20) (a) pengamatan pada lampu UV 254 (b) penyemprotan dengan anisaldehyd (c) penyemprotan dengan alfa naftol, (2) eluen butanol : asam asetat : air (2:1:1) (d) pengamatan pada lampu UV 254 (e) penyemprotan dengan anisaldehyd dan (f) penyemprotan dengan penampak alfa naftol.....	40
4.4 Hasil optimasi lanjutan pada plat silika gel 60 F ₂₅₄ ukuran 10 x 10 cm, eluen butanol : asam asetat : air (2:1:1), pengamatan pada lampu UV 254 dan penyemprotan penampak bercak alfa naftol	40
4.5 Hasil eluasi menggunakan plat silika gel 60 F ₂₅₄ ukuran 10 x 20 cm, eluen butanol : asam asetat : air (2:1:1) pada UV 254 dan penampak bercak alfa naftol.....	44
4.6 Hasil densitometri profil spektrum ekstrak kasar enzim dan produk hidrolisis CMC Na.....	48

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
A. Hasil Uji Statistik Kurva Standar Glukosa.....	60
B. Kurva Standar Protein dan Contoh Perhitungan Kadar Protein Ekstrak Kasar EnzimSelulase SF01iabilitas Kuesioner.....	61
C. Hasil Uji dan Contoh Cara Perhitungan Aktivitas Spesifik Ekstrak Kasar Enzim Selulase SF01 dengan Metode DNS.....	63
D. Hasil KLT-Densitometri.....	64