

**PERMURNIAN PARSIAL EKSTRAK KASAR ENZIM SELULASE
DARI *Bacillus subtilis* STRAIN SF01 DENGAN METODE
PENGENDAPAN AMMONIUM SULFAT**



SHINTA YASMIEN GUNAWAN

2443013049

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

**PERMURNIAN PARSIAL EKSTRAK KASAR ENZIM SELULASE
DARI *Bacillus subtilis* STRAIN SF01 DENGAN METODE
PENGENDAPAN AMMONIUM SULFAT**

SKRIPSI

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

OLEH :

**SHINTA YASMIEN GUNAWAN
2443013049**

Telah disetujui pada tanggal 09 Juni 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



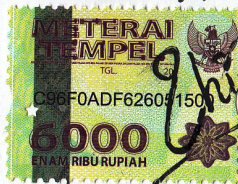
Prof. Dr. J.S. Ami Soewandi., Apt
NIK. 241.02.0452

**LEMBAR PERSETUJUAN
PUBLIKASI KARYA ILMIAH**

Demi perkembangan ilmu pengetahuan, saya menyetujui skripsi/karya ilmiah saya, dengan judul: **Permurnian Parsial Ekstrak Kasar Enzim Selulase dari *Bacillus subtilis* Strain SF01 dengan Metode Pengendapan Ammonium Sulfat** 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 saya buat dengan sebenarnya.

Surabaya, 9 Juni 2017



Shinta Yasmien Gunawan
2443013049

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

Surabaya, 9 Juni 2017



Shinta Yasmien Gunawan

2443013049

ABSTRAK

PERMURNIAN PARSIAL EKSTRAK KASAR ENZIM SELULASE DARI *Bacillus subtilis* STRAIN SF01 DENGAN METODE PENGENDAPAN AMMONIUM SULFAT

SHINTA YASMIEN GUNAWAN
2443013049

Enzim selulase merupakan enzim yang berperan penting pada perubahan selulose menjadi molekul glukosa. Enzim selulase yang berasal dari *Bacillus subtilis* Strain SF01 memiliki potensi besar untuk dikembangkan dalam berbagai bidang khususnya industri farmasi. Pemurnian parsial dengan ammonium sulfat atau $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pada ekstrak kasar enzim selulase asal *Bacillus subtilis* Strain SF01 dilakukan dengan tujuan untuk memisahkan dan memurnikan secara parsial enzim selulase dari protein-protein lain selain enzim yang terdapat dalam ekstrak kasar enzim. Setelah proses pemurnian diharapkan aktivitas spesifik enzim dapat meningkat karena kontaminan yang terdapat pada enzim telah dihilangkan. Metode pengendapan dengan menggunakan garam ammonium sulfat bekerja berdasarkan prinsip *salting out* yakni dengan mengubah kelarutan protein untuk menghilangkannya dari larutan dengan penambahan garam dalam konsentrasi tinggi. Untuk dapat mengetahui kejenuhan ammonium sulfat dengan aktivitas spesifik tertinggi dilakukan optimasi kejenuhan ammonium sulfat dengan berbagai konsentrasi yaitu dari 20%-90% kejenuhan. Berdasarkan hasil optimasi pemurnian parsial pada enzim selulase asal *Bacillus subtilis* Strain SF01 tidak dapat dilakukan dengan menggunakan metode pengendapan ammonium sulfat. Penambahan ammonium sulfat dengan konsentrasi 20% menunjukkan adanya penurunan aktivitas spesifik enzim. Aktivitas spesifik enzim terus mengalami penurunan setelah pengendapan diatas 20% kejenuhan ammonium sulfat. Hal ini berkaitan dengan ketidakstabilan enzim selulase yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis* Strain SF01 terhadap ammonium sulfat diduga berkaitan dengan sifat hidrofobisitas yang cukup tinggi dari enzim selulase.

Kata Kunci : pemurnian parsial, ammonium sulfat, *Bacillus subtilis* Strain SF01, enzim selulase.

ABSTRACT

PARTIAL PURIFICATION OF CRUDE EXTRACT OF CELLULASE ENZYME FROM *Bacillus subtilis* STRAIN SF01 USING AMMONIUM SULPHATE PRECIPITATION METHOD

SHINTA YASMIEN GUNAWAN

2443013049

Cellulase enzyme is an important enzyme for transformation of cellulose into glucose. Cellulase enzyme from *Bacillus subtilis* Strain SF01 have great potency for industrial pharmacy. Partial purification with ammonium sulfate or $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in crude extract of cellulase enzyme from *Bacillus subtilis* Strain SF01 was done to separate and partially purify cellulase enzyme from other protein contained in crude enzyme extract. After the purification, specific activity of enzyme was expected to increase as the contaminants in the enzyme have been removed. Precipitation method using ammonium sulphate salt is based on the principle of salting out by changing the solubility of protein to remove it from solution by addition of salt in high concentration. To be able to know the saturation level of ammonium sulfate with the highest specific activity, saturation of ammonium sulfate was optimized with various concentrations ranging from 20%-90%. The optimization results showed that partial purification of cellulase enzyme from *Bacillus subtilis* Strain SF01 could not be done by using ammonium sulfate precipitation method. The addition of ammonium sulfate with a concentration of 20% decreased the specific activity enzyme. The specific activity enzyme continued to decrease after precipitation using above 20% saturation of ammonium sulfate. This was related to the cellulase enzyme instability produced by *Bacillus subtilis* Strain SF01 against ammonium sulfate related to the high hydrophobicity of the cellulase enzyme.

Keywords : partial purification, Ammonium sulphate, *Bacillus subtilis* Strain SF01, cellulase enzyme

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Tuhan yang Maha Esa atas berkat, rahmat dan karuniaNya, penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **Permurnian Parsial Ekstrak Kasar Enzim Selulase Dari *Bacillus Subtilis* Strain Sf01 Dengan Metode Pengendapan Ammonium Sulfat**. Skripsi ini diajukan sebagai salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi di Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya.

Penulis berterima kasih kepada semua pihak yang telah memberikan dukungan baik secara materil maupun moral. Penulis menyadari bahwa tanpa dukungan dari berbagai pihak, sangatlah sulit bagi penulis untuk dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik. Penulis juga menyadari adanya kekurangan dalam penulisan naskah skripsi ini yang masih jauh dari sempurna. Dalam penulisan skripsi ini, penulis banyak menerima masukan, bimbingan, saran, dan juga motivasi dari berbagai pihak. Oleh karea itu, penulis mengucapkan terimakasih kepada :

1. Tuhan Yesus Kristus atas berkat pertolongan, hikmat dan rahmatNya yang luar biasa dalam kehidupan penulis sehingga selalu dikuatkan dan diteguhkan dalam setiap proses penyusunan skripsi ini sehingga dapat terselesaikan dengan baik.
2. Mama saya Lianti, Papa saya Gunawan Wibisono, Cece saya Ratna Ariestyia Gunawan, Cefu saya John Lee, serta seluruh keluarga besar yang telah memberikan dukungan baik secara moral, materil dan kasih serta cinta kepada saya sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.
3. Ibu Dr. F. V. Lanny Hartanti, S.Si., M.Si, dan Bapak Henry Kurnia S., S.Si., M.Si., Apt. selaku pembimbing yang telah meluangkan waktu dan tenaganya untuk memberikan dukungan, petunjuk, pemikiran, petuah,

wejangsan dan saran yang sangat berharga selama penelitian hingga penyusunan naskah skripsi ini.

4. Bapak Prof. Dr. Ami Soewandi, Apt. dan Ibu Ni Nyoman Purwani, S.Si., M.Si selaku tim penguji yang telah memberikan kritik dan saran yang sangat berguna dan membangun bagi penyusunan skripsi ini.
5. Bapak Drs. Kuncoro Foe, Ph.D., G.Dip.Sc., Apt. selaku Rektor Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya dan sekaligus wali studi, atas pemberian sarana ,prasarana, saran dan dukungan serta kesempatan yang diberikan untuk menempuh pendidikan di Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya.
6. Dekan Fakultas Farmasi Ibu Sumi Wijaya, S.Si., Ph.D., Apt. yang telah membantu dalam memberikan sarana dan fasilitas sehingga skripsi ini dapat selesai dengan baik.
7. Segenap dosen dan pimpinan Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya yang telah banyak mengajarkan ilmu-ilmu kefarmasian selama masa perkuliahan yang bermanfaat bagi penyelesaian skripsi ini.
8. Fakultas Farmasi dan LPPM Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya sebagai institusi penyumbang dana selama pengerjaan skripsi.
9. Kepala laboratorium Proteomik Institute Tropical Disease Universitas Airlangga Ibu Nyoman Tri Puspaningsih yang telah mengizinkan penulis menggunakan sarana, prasana penunjang, serta saran dan masukan sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.
10. Teman-teman seperjuangan skripsi Magdalena, Lia, Anggi, Mbak Anna, Ajeng, Ester, Stevi, Nita, Ade, Dewi untuk saran-saran dan semangat dalam menyelesaikan penelitian ini.
11. Teman-teman angkatan 2013 semuanya tanpa terkecuali yang telah menjadi bagian dari perjuangan meraih gelar S.Farm.

12. Kakak tingkat Fakultas Farmasi khususnya Ce Lavenia, Ko Billy Oentoro, Ko Christian, Kak Liana, Kak Putri yang telah memberikan saran-saran dan masukan yang bermanfaat untuk penyelesaian penelitian ini.
13. Mbak Tyas, Mas Antok, Mbak Evi, Mas Dwi selaku laboran yang telah membantu penulis dalam pengerjaan skripsi ini sehingga dapat terselesaikan dengan baik.
14. Tim Laboratorium Proteomik Ibu Nyoman Tri Puspaningsih, Mbak Anita, Mbak One, Mbak Nyoman, Mbak Silvi, Mbak Selvia, Mas Jaya, Bu Evi, Nita, Nunik yang tetap tulus dan sabar dalam memberikan penjelasan dan arahan kepada penulis selama proses bekerja di laboratorium dan penyusunan naskah skripsi ini.
15. Pihak-pihak lain yang telah memberikan dukungan dan bantuan selama proses pengerjaan penelitian ini.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini masih terdapat banyak kekurangan. Oleh karena itu, penulis menerima kritik dan saran yang membangun untuk perbaikan skripsi ini. Akhir kata, penulis mengharapkan skripsi ini dapat bermanfaat dan berguna bagi kemajuan ilmu pengetahuan khususnya bioteknologi enzim.

Surabaya, Mei 2017

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	i
ABSTRACT	ii
KATA PENGANTAR.....	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang Penelitian.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	6
1.4 Hipotesa Penelitian	6
1.5 Manfaat Penelitian.....	6
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Tinjauan tentang Enzim	7
2.1.1. Pengertian tentang Enzim	7
2.1.2. Mekanisme Kerja Enzim Dan Substrat.....	8
2.1.3. Aktivitas Spesifik Enzim	11
2.1.4. Faktor-Faktor yang dapat Mempengaruhi Kerja Enzim	13
2.2 Tinjauan tentang Enzim Selulase.....	18
2.3 Tinjauan tentang Isolat Bakteri <i>Bacillus subtilis</i> Strain SF01.....	20
2.4 Tinjauan tentang Selulosa	21
2.5 Tinjauan tentang Pemurnian Enzim.....	22
2.5.1. Pemurnian dengan Metode Kromatografi....	23

	Halaman
2.5.2. Pemurnian dengan Metode Non Kromatografi.....	25
2.6 Tinjauan tentang Ultrafiltrasi Menggunakan Amicon	32
2.7 Tinjauan tentang <i>Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Elektroforesis</i> (SDS-PAGE) dan Zimogram.....	33
BAB III. METODOLOGI PENELITIAN	37
3.1 Jenis Penelitian	37
3.2 Sampel, Bahan dan Alat Penelitian.....	37
3.2.1. Sampel Penelitian.....	37
3.2.2. Bahan Penelitian	37
3.2.3. Alat Penelitian.....	38
3.3 Metode Penelitian	38
3.3.1. Pembuatan Media.....	38
3.3.2. Pembuatan Reagensia.....	39
3.3.3. Produksi Ekstrak Kasar Enzim Selulase	41
3.3.4. Pembuatan Kurva Standar Glukosa.....	42
3.3.5. Pembuatan Kurva Standar Protein.....	42
3.3.6. Penentuan Kadar Protein Ekstrak Kasar Enzim Selulase.....	43
3.3.7. Pengujian Aktivitas Enzim Selulase dengan Metode Asam 3,5-Dinitrosalitilat (DNS).....	43
3.3.8. Pemurnian Parsial Enzim Selulase	44
3.3.9. Analisis SDS-PAGE.....	46
3.3.10. Analisis Zimogram.....	47
3.4 Analisis Data	48
3.5 Diagram Alir Penelitian	50
3.6 Diagram Alir Pemurnian Enzim	51

	Halaman
BAB IV. HASIL PEMBAHASAN	
4.1 Hasil Percobaan.....	56
4.1.1. Uji Mikrobiologi Isolat <i>Bacillus subtilis</i> Strain SF01	56
4.1.2. Kurva Standar Glukosa.....	59
4.1.3. Kurva Standar Protein	60
4.1.4. Optimasi Pemurnian Parsial Ekstrak Kasar Enzim Selulase Dari <i>Bacillus subtilis</i> Strain SF01 Dengan Menggunakan Ammonium Sulfat Konsentrasi 20% - 90%.	62
4.2 Pembahasan.....	66
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	73
5.1 Kesimpulan	73
5.2 Saran.....	73
DAFTAR PUSTAKA.....	74
LAMPIRAN	79

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Perbandingan Pemurnian Protein dengan Metode Kromatografi Dan Non Kromatografi	22
2.2 Penambahan Ammonium Sulfat (G) dalam 1 Liter Larutan Untuk mempersiapkan Larutan Ammonium Sulfat Konsentrasi Tertentu	30
3.1 Hasil Pemurnian Ekstrak Kasar Enzim Selulase dari <i>Bacillus subtilis</i> Strain SF01 dengan Metode Pengendapan Ammonium Sulfat	54
4.1 Data Kurva Standar Glukosa.....	59
4.2 Data Kurva Standar Protein	61
4.3 Hasil Optimasi Pemurnian Parsial Ammonium Sulfat.....	63
4.4 Hasil Pemurnian Ekstrak Kasar Enzim Selulase Dari <i>Bacillus subtilis</i> Strain SF01 Dengan Metode Pengendapan Ammonium Sulfat	64
4.5 Hasil Pengujian yang Dilakukan pada Endapan yang Dihasilkan Sesudah Pengendapan dengan Ammonium Sulfat	65
4.6 Hasil Pengujian yang Dilakukan pada Supernatan yang Dihasilkan Sesudah Pengendapan dengan Ammonium Sulfat	65

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Model <i>lock and key</i>	10
2.2 Model <i>induced fit</i>	11
2.3 Pengaruh konsentrasi enzim terhadap laju reaksi yang dikatalisasi oleh enzim ketika konsentrasi substrat, suhu, dan pH konstan.....	13
2.4 Pengaruh konsentrasi substrat terhadap laju reaksi yang dikatalisasi oleh enzim ketika konsentrasi enzim, suhu, dan pH konstan	14
2.5 Pengaruh suhu (°C) pada laju reaksi setelah dikatalisasi oleh enzim ketika konsentrasi substrat, enzim dan pH tetap.....	15
2.6 Pengaruh pH pada laju reaksi yang dikatalisasi oleh enzim konsentrasi substrat, enzim dan suhu konstan	16
2.7 Struktur Selulosa	18
2.8 Tahap Pemecahan Selulosa oleh Enzim Selulase	19
2.9 Interaksi antara pelarut organik dan daerah hidrofobik pada protein.....	32
2.10 Skema SDS-PAGE.....	35
3.1. Diagram alir penelitian	50
3.2 Diagram Alir Pemurnian Enzim (Pemurnian dengan menggunakan ammonium sulfat untuk menentukan konsentrasi optimum)	51
3.3 Diagram Alir Pemurnian Enzim (Pemurnian dengan menggunakan ammonium sulfat untuk menentukan konsentrasi optimum).	52
3.4 Diagram Alir Pemurnian Enzim (Desalting menggunakan amicon).....	53
4.1 Isolat <i>Bacillus subtilis Strain SF01</i> pada media NA yang ditambahkan CMC-Na.....	57
4.2 Isolat <i>Bacillus subtilis Strain SF01</i> dengan pewarnaan gram	58

Gambar	Halaman
4.3 Hasil pengujian kualitatif enzim selulase/ test kongo red	58
4.4 Grafik Kurva Standar Glukosa.....	60
4.5 Grafik Kurva Standar Protein.....	61
4.6 Warna Standar Protein.....	62
4.7 Grafik Optimasi Pemurnian Parsial Ammonium Sulfat.....	66

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
A. Uji Mikrobiologi Isolat <i>Bacillus Subtilis</i> Strain SF01	79
B. Hasil Uji Statistik Kurva Standar Glukosa	79
C. Contoh Perhitungan Kadar Protein Enzim	82
D. Contoh Perhitungan Penentuan Aktivitas Enzim Selulase Dengan Metode DNS.....	83
E. Tabel F.....	84