

**PENGARUH BEBERAPA SENYAWA PEREDUKSI
TERHADAP AKTIVITAS EKSTRAK KASAR SELULASE
ASAL *Bacillus subtilis* SF01**



PAULA YOITA SUHARTO

2443012040

PROGRAM STUDI S1

FAKULTAS FARMASI

UNIVERSITAS KATOLIK WIDYA MANDALA SURABAYA

2015

**PENGARUH BEBERAPA SENYAWA PEREDUKSI
TERHADAP AKTIVITAS EKSTRAK KASAR SELULASE
ASAL *Bacillus subtilis* SF01**

SKRIPSI

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

OLEH:
PAULA YOITA SUHARTO
2443012040


Pembimbing I



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

NIK. 241.00.0437

Pembimbing II,



Henry Kurnia Setiawan, 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: **PENGARUH BEBERAPA SENYAWA PEREDUKSI TERHADAP AKTIVITAS EKSTRAK KASAR SELULASE ASAL *Bacillus subtilis* SF01** 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, 12 Januari 2016



Paula Yoita Suharto

2443012040

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, 12 Januari 2016



Paula Yoita Suharto
24443012040

ABSTRAK

PENGARUH BEBERAPA SENYAWA PEREDUKSI TERHADAP AKTIVITAS EKSTRAK KASAR SELULASE ASAL *Bacillus subtilis* SF01

Paula Yoita Suharto
2443012040

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh senyawa pereduksi DTT (dithiothreitol), 2-merkaptobetanol, dan glutation terhadap aktivitas ekstrak kasar selulase asal *Bacillus subtilis* strain SF01. Produksi enzim selulase dilakukan pada media Nutrient Broth ditambah dengan substrat *Carboxymethyl Cellulose* (CMC) 1% selama 20 jam. Enzim ekstraseluler kasar selulase yang dihasilkan ditentukan kadar proteinnya dengan metode Bradford dan pembandingan Bovine Serum Albumin (BSA). Aktivitas enzim selulase (Unit/mL) pada pH 5,0, suhu 60°C, dan substrat CMC 1% ditentukan secara spektrofotometri berdasarkan pengukuran kadar gula pereduksi dengan metode asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS) dan pembandingan D(+) glukosa monohidrat. Pengaruh penambahan senyawa pereduksi diteliti dengan menginkubasi ketiga senyawa uji masing-masing dengan enzim selama 20 menit sebelum diuji aktivitasnya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa *dithiothreitol* (DTT), glutation (GSH), dan 2-merkaptobetanol (2-ME) meningkatkan aktivitas spesifik selulase (Unit/mg) asal *Bacillus subtilis* strain SF01 secara bermakna (*One way ANOVA, post hoc Tukey HSD, $\alpha = 95\%$*).

Kata Kunci: selulase, *Bacillus subtilis* strain SF01, *dithiothreitol*, 2-merkaptobetanol, glutation.

ABSTRACT

THE EFFECT OF SEVERAL REDUCING AGENTS ON THE ACTIVITY OF CRUDE EXTRACT OF CELLULASE ORIGINATED FROM *Bacillus subtilis* SF01

Paula Yoita Suharto
2443012040

The aim of the research was to observe the effect of several reducing agents, i.e. *dithiothreitol* (DTT), 2-mercaptoethanol, and glutathione towards the activity of crude cellulase enzyme from *Bacillus subtilis* strain SF01. Cellulase was produced in Nutrient Broth media contained CMC 1% for 20 hours. The crude extract of cellulase enzyme was determined its protein contain using Bradford method and BSA as protein standard. The cellulase activity (Unit/mL) at pH 5.0, 60°C and CMC 1% as substrate was determined spectrophotometrically based on the measurement of reducing sugars yielded after reaction with 3,5-dinitrosalisylic acid and D(+) glucose monohydrate as standard. Cellulase from *Bacillus subtilis* SF01 was incubated by each of reducing agents for 20 minutes prior to its activity measurements. The results showed that the specific activity of cellulase (Unit/mg) was significantly enhanced in the presence of thiol protecting reagents like dithiothreitol (DTT), 2-mercaptoethanol (2-ME), and glutathione (GSH) (*One way ANOVA, post hoc Tukey HSD, $\alpha = 95\%$*).

Keywords: cellulase, *Bacillus subtilis* strain SF01, *dithiothreitol*, 2-mercaptoethanol, glutathione.

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yesus Kristus atas segala anugerah dan hikmat-Nya, sehingga skripsi dengan judul **“PENGARUH BEBERAPA SENYAWA PEREDUKSI TERHADAP AKTIVITAS EKSTRAK KASAR SELULASE ASAL *Bacillus subtilis* SF01”** dapat terselesaikan. Penyusunan skripsi ini dimaksudkan untuk memenuhi persyaratan dalam memperoleh gelar Sarjana Farmasi di Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada pihak-pihak yang telah membantu selama proses penyusunan naskah skripsi ini:

1. Ibu Dr. Lanny Hartanti, M.Si. dan Bapak Henry Kurnia Setiawan, M.Si.,Apt. selaku pembimbing yang telah meluangkan waktu, tenaga, dukungan, petunjuk, pemikiran, petuah, wejangan, dan saran yang sangat berharga dari awal hingga akhir penelitian serta penyusunan naskah skripsi ini.
2. Bapak Prof. Dr. Ami Soewandi, Apt. dan Ibu Dra. Hj. Emi Sukarti., M.Si., Apt. selaku tim penguji yang telah memberikan kritik dan saran yang sangat berguna bagi penyusunan skripsi ini.
3. Fakultas Farnasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya sebagai institusi penyumbang dana selama proses penelitian skripsi.
4. Kepala laboratorium Analisis Sediaan Farmasi UNIKA Widya Mandala Surabaya, Bapak Henry Kurnia Setiawan, M.Si.,Apt. yang telah mengizinkan penulis menggunakan sarana dan prasana penunjang sehingga skripsi ini boleh terselesaikan dengan baik.
5. Asisten Laboraturium Analisis Sediaan Farmasi UNIKA Widya Mandala Surabaya, Ibu Tyas yang telah mengawasi, memberikan

- arahan, dan menyediakan sarana penunjang kepada penulis selama proses penelitian skripsi.
6. Kepala laboratorium Proteomik *Institute of Tropical Disease* Universitas Airlangga yang telah mengizinkan penulis menggunakan sarana dan prasarana penunjang sehingga skripsi ini boleh terselesaikan dengan baik.
 7. Tim *supervisor* Lab Proteomik *Institute of Tropical Disease* Universitas Airlangga, Mas Ivan, Mbak Anita dan Mbak One yang memberikan penjelasan dan arahan kepada penulis selama proses pengerjaan dan penyusunan naskah skripsi ini.
 8. Bapak Drs. Kuncoro Foe, Ph.D., G.Dip.Sc., Apt. selaku Rektor Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan dalam menempuh pendidikan Sarjana Farmasi di Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya.
 9. Dekan Fakultas Farmasi Ibu Martha Ervina, S.Si, M.Si., Apt yang telah membantu dalam memberikan sarana dan fasilitas sehingga skripsi ini terselesaikan dengan baik.
 10. Ibu Catherine Caroline, M.Si., Apt selaku penasehat akademik yang telah memberikan dorongan dan arahan sehingga skripsi ini terselesaikan dengan baik.
 11. Papa (Gito Suharto), Mama (Wati Rahayu), Ce Bing (Lusiana Hendrika, S.E), Ce Li (Pamela Felita, S.E), Ko Danny A.S yang telah memberikan dukungan moral maupun materi sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.
 12. Teman – teman seperjuangan SF01 *crew* Kak Putri (Sonde), Ce Revon, Billy, Lavenia, Liana, Kristian yang telah banyak membantu dan bekerja sama dengan baik demi terselesaikannya skripsi ini.

13. Sahabat – sahabat tercinta Erniawati, Eltina Maria B, Cynthia Tanujaya, Cynthia Devina, Velisiana M.S, teman-teman pemuda Kairos GKT Hosana Bumi Permai Surabaya yang telah memberikan semangat dan doa dari awal hingga akhir penyusunan naskah skripsi ini.

Penulis menyadari atas segala kekurangan dari segi pengalaman, pengetahuan, dan pustaka yang ditinjau dalam penyusunan naskah Skripsi ini. Akhir kata penulis mengharapkan kritik dan saran agar naskah skripsi ini dapat lebih disempurnakan.

Surabaya, 12 Januari 2016,

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	i
<i>ABSTRACT</i>	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Penelitian	1
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.4. Hipotesis Penelitian	5
1.5. Manfaat Penelitian	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. Tinjauan Tentang Enzim	6
2.1.1. Mekanisme Katalisis Enzim	7
2.1.2. Kinetika Enzim	8
2.1.3. Aktivitas Enzim	10
2.2. Tinjauan Tentang Enzim Selulase	11
2.3. Tinjauan Tentang Selulase Asal Isolat Bakteri SF01	13
2.4. Tinjauan Tentang Senyawa Pereduksi	16
2.4.1. Senyawa 2-merkptoetanol	19
2.4.2. Senyawa <i>Dithiothreitol</i> (DTT)	22
2.4.3. Senyawa Glutation	25

	Halaman
2.5. Tinjauan Tentang Spektrofotometri UV-Vis	27
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN	31
3.1. Jenis Penelitian	31
3.2. Sampel, Bahan Dan Alat Penelitian	31
3.2.1. Sampel Penelitian	31
3.2.2. Bahan Penelitian	32
3.2.3. Alat Penelitian	32
3.3. Metode Penelitian	33
3.3.1. Pembuatan media, reagen, larutan senyawa pereduksi	33
3.3.1.1 Pembuatan Media	33
3.3.1.1.a Pembuatan Media Padat	33
3.3.1.1.b Pembuatan Media Cair	33
3.3.1.2 Pembuatan Reagen	33
3.3.1.2.a Reagen Asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS)	33
3.3.1.2.b Reagen Bradford	34
3.3.1.2.c NaOH 6 N dan HCl 6 N	34
3.3.1.2.d Buffer Universal pH 5	34
3.3.1.2.e Pembuatan Substrat CMC 1%	35
3.3.1.3. Pembuatan Larutan Senyawa Produksi	35
3.3.1.3.a Larutan <i>Dithiothreitol</i> (DTT)	35
3.3.1.3.b Larutan 2-merkaptotanol	36
3.3.1.3.c Larutan Glutation	36
3.3.2. Produksi Enzim Selulase	37
3.3.3. Pembuatan Kurva Standar Glukosa	37
3.3.4. Pembuatan kurva standar BSA dan uji kadar protein	38

	Halaman
3.3.5. Uji Aktivitas Selulase	39
3.3.5.1 Blangko Substrat	39
3.3.5.2 Uji Aktivitas Selulase Tanpa Penambahan Senyawa Pereduksi (0 Mm)	40
3.3.5.3 Uji aktivitas selulase dengan penambahan senyawa pereduksi	40
3.4. Analisis data	41
3.4.1 Data kurva standar glukosa	41
3.4.2 Data kurva standar BSA dan kadar protein	42
3.4.3 Data aktivitas spesifik enzim dengan penambahan senyawa pereduksi	42
3.4.4 Analisis statistika	43
3.5. Diagram alir penelitian	44
BAB 4. HASIL PERCOBAAN DAN PEMBAHASAN	46
4.1. Hasil percobaan	46
4.1.1. Kurva standar glukosa	46
4.1.2. Kurva standar <i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA)	48
4.1.3. Aktivitas spesifik selulase dengan penambahan DTT .	49
4.1.4. Aktivitas spesifik selulase dengan penambahan 2-merkaptotanol	51
4.1.5. Aktivitas spesifik selulase dengan penambahan glutation	53
4.2. Pembahasan	55
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	59
5.1. Kesimpulan	59
5.2. Saran	59
Daftar Pustaka	60
Lampiran	64

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1. Hasil Pengamatan Dengan Penyiraman Larutan Congo-Red 0,1%	14
2.2. Hasil BLAST Isolat Bakteri SF01	15
2.3. Intensitas Warna Dan Panjang Gelombangnya Pada Daerah Visibel	29
4.1. Data Kurva Standar Glukosa	46
4.2. Data Kurva Standar BSA	48
4.3. Data Kadar Protein	49
4.4. Aktivitas Spesifik Selulase Dengan Penambahan <i>Dithiothreitol</i> (DTT)	51
4.5. Aktivitas Spesifik Selulase Dengan Penambahan 2- merkaptotanol	53
4.6. Aktivitas Spesifik Selulase Dengan Penambahan Glutation	55

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Reaksi enzimatis	6
2.2. Macam-macam selulase	13
2.3. <i>Clear zone</i> pada isolat A dan B	14
2.4. Pohon filogenetik isolat bakteri SF01	15
2.5. Kurva produksi selulase	16
2.6. Struktur endo-1,4-beta-glukanase dari <i>B. subtilis</i> 168 dengan ion Mn^{2+}	16
2.6. Struktur 2D enzim Hsp33 asal <i>Bacillus subtilis</i> Hsp33	18
2.7. Mekanisme S_N-2 enzim Hsp33 asal <i>Bacillus subtilis</i> Hsp33 oleh DTT	19
2.8. Struktur 2-merkapttoetanol 2D dan 3D	20
2.9. Pemutusan ikatan disulfida oleh 2-merkapttoetanol terhadap protein	21
2.10. Aplikasi 2-merkapttoetanol sebagai agen pereduksi senyawa disulfide	21
2.11. Struktur senyawa dithiothreitol (DTT) 2D dan 3D	23
2.12. Proses reduksi: pemutusan ikatan disulfida pada protein oleh DTT	24
2.13. Oksidasi tiol dan reduksi disulfida	25
2.14. Struktur glutation (GSH) 2D dan 3D	26
2.15. Pemutusan ikatan disulfida oleh glutation (reduksi)	26
2.16. Instrumen spektrofotometri	28
3.1. Reaksi reduksi-oksidasi antara glukosa dan asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS)	38

	Halaman
3.2. Diagram alir penelitian	44
3.3. Skema uji aktivitas enzim dengan penambahan senyawa pereduksi	45
4.1. Kurva standar glukosa	47
4.2. Kurva standar BSA	48
4.3. Profil Kurva Aktivitas Spesifik Selulase Dengan Penambahan DTT	50
4.4. Profil Kurva Aktivitas Spesifik Selulase Dengan Penambahan 2-Merkaptoetanol	52
4.5. Profil Kurva Aktivitas Spesifik Selulase Dengan Penambahan Glutation	54

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Pembuatan reagen	64
2. Spektra UV-Vis Kurva Standar Glukosa Konsentrasi 600 ppm (Hari I)	66
3. Tabel F	67
4. Tabel r	68
5. Hasil uji statistik kurva standar glukosa	69
6. Hasil uji statistik Stem-and-Leaf Plots	70
7. Hasil uji statistik dengan penambahan dithiothreitol (DTT)	71
8. Hasil uji statistik dengan penambahan 2-merkaptotanol	74
9. Hasil uji statistik dengan penambahan glutation	79
10. Hasil uji mikrobiologi	80