

ISOLASI DAN KARAKTERISASI ENZIM SELULASE

Oleh

Masfufatun

Dosen Fakultas Kedokteran Universitas Wijaya Kusuma Surabaya

ABSTRAK

Carboxy Methyl Cellulose (CMC) merupakan turunan selulosa yang mudah larut dalam air. Oleh karena itu CMC mudah dihidrolisis menjadi gula-gula sederhana oleh enzim selulase. Bekicot adalah hewan lunak, mudah berkembang biak dan memanfaatkan selulosa sebagai sumber energinya serta kandungan proteinnya cukup tinggi. Oleh karena itu bekicot dapat dijadikan sebagai sumber enzim selulase untuk menghidrolisis Carboxy Methyl Cellulose (CMC)

Penelitian ini bertujuan untuk isolasi enzim selulase dari bekicot, *Achatina fulica* dan menentukan karakterisasinya. Kadar Glukosa yang dihasilkan dari aktivitas enzim selulosa dianalisa dengan menggunakan metode Semogy-Nelson. Dari penelitian ini ternyata enzim selulase yang diisolasi dari hepatopankreas bekicot, *Achatina fulica* memiliki aktivitas spesifik sebesar 2,85 U/mg protein dan beraktivitas optimum pada suhu 50°C dan pH 5,16 serta memiliki parameter kinetik harga V_m sebesar 0,23mg/mL per menit dan K_m sebesar 0,53 mg/mL. Bagian enzim selulosa mulai jenuh pada konsentrasi 4%.

Kata kunci : Carboxy Methyl Cellulose, hidrolisis, selulase

ISOLATION AND CHARACTERIZATION cellulase

By

Masfufatun

Lecturer Faculty of Medicine, University of Wijaya Kusuma Surabaya

ABSTRACT

Carboxy Methyl Cellulose (CMC) is a derivative of cellulose soluble in water. Therefore, CMC easily hydrolyzed into simple sugars by the enzyme cellulase. Snails are animals soft, easy to breed and utilize cellulose as a source of energy and protein content is high enough. Therefore, snails can be used as a source of cellulase enzyme to hydrolyze carboxy Methyl Cellulose (CMC)

This research aims to isolate cellulase enzyme from the snail, *Achatina fulica* and determine its characterization. Glucose levels produced from cellulase enzyme activity were analyzed by using the method Semogy-Nelson. From this research it turns out cellulase enzyme isolated from hepatopankreas snail, *Achatina fulica* has a specific activity of 2.85 U / mg protein and activity 50°C and temperature optimum at pH 5.16 and have had kinetic parameters V_m price of 0.23 mg / mL per minute and K_m is 0.53 mg / mL. Part enzyme cellulose getting fed at a concentration of 4%.
Keywords: carboxy Methyl Cellulose, hydrolysis, cellulase

Pendahuluan

Selulosa merupakan biomolekul yang paling banyak ditemukan di alam dan merupakan unsur utama penyusun kerangka tumbuhan. Diperkirakan sekitar 10^{11} ton selulosa dibiosintesis tiap tahun. Daun kering mengandung 10-20% selulosa; kayu 50% dan kapas 90% (Kolman, 2001). Selama ini limbah pertanian maupun kehutanan, seperti jerami gandum maupun padi, tongkol jagung, bagas, kulit kacang dan lain-lain belum dimanfaatkan secara optimal, padahal limbah-limbah tersebut merupakan sumber energi yang potensial. Kandungan selulosanya yang tinggi sehingga dapat dikonversi menjadi gula-gula sederhana (gula pereduksi) dan

selanjutnya difermentasi menjadi etanol oleh khamir atau bakteri.

Carboxy Methyl Cellulose (CMC) merupakan turunan selulosa, kopolimer dua unit β -D glukosa dan β -D-glukopiranososa 2-O-(karboksilmetil)-garam monosodium yang terikat melalui ikatan β -1,4-glikosidik. CMC memiliki kelarutan lebih tinggi daripada selulosa, sehingga mudah dihidrolisis. Hidrolisis CMC menjadi gula-gula sederhana dapat dilakukan dengan menggunakan katalis asam, enzim maupun mikroba selulolitik. Beberapa penelitian melaporkan bahwa proses hidrolisis secara enzimatik lebih menguntungkan daripada menggunakan asam. Selain tidak menimbulkan masalah korosi dan berlangsung pada kondisi *mild* (pH 4,8

dan suhu 50°C), ternyata proses hidrolisis secara enzimatis menghasilkan *yield* lebih tinggi daripada hidrolisis yang dikatalisis asam (Duff and Murray, 1996). Enzim selulase diproduksi oleh mikroba selulolitik dari golongan bakteri dan jamur. Permasalahan yang sering muncul dalam penelitian adalah kurang tersedianya enzim selulase yang murah dan efisien. Salah satu alternatif untuk mengatasi hal ini adalah dengan memanfaatkan bekicot sebagai sumber enzim selulase. Selama ini bekicot banyak digunakan sebagai pakan ternak karena kandungan proteinnya yang cukup tinggi (75 gram/100gram daging bekicot). Silaban, R., 1999 menemukan mikroba selulolitik, *Pseudomonas alcaligenes PaAf-18* di dalam tubuh bekicot. Mikroba selulolitik tersebut memproduksi enzim selulase untuk mencerna makanan (selulosa) dan sebagian disimpan dalam hepatopankreas yang salurannya bermuara ke sistem pencernaan. Isolasi enzim selulase dari hepatopankreas bekicot lebih mudah dilakukan daripada isolasi dari bakteri atau jamur, yakni melalui proses dekstruksi sel, homogenasi dan sentrifugasi.

Dalam melakukan kerja katalitiknya, aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu konsentrasi substrat, pH, suhu, konsentrasi enzim dan waktu reaksi (Price, 1979). Di industri pengungkapan sifat dan karakteristik suatu produk enzim sangat diperlukan untuk efisiensi proses produksi dan lebih jauh akan difungsikan untuk memperoleh produk akhir yang berkualitas. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk isolasi enzim selulase dari bekicot, *Achatina fulica* dan menentukan karakteristiknya yang meliputi kondisi suhu, pH, konsentrasi substrat dan parameter kinetik. Dari penelitian diharapkan glukosa sebagai hasil hidrolisis dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku pembuatan etanol.

Bahan dan Metode

Bahan-bahan utama yang diperlukan dalam penelitian ini adalah bekicot, *Achatina fulica* sebagai sumber enzim, diperoleh dari perladangan

mayarakat Sidoarjo, dipilih yang besar dan cangkangnya masih utuh. *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) sebagai substrat dalam proses hidrolisis diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Airlangga Surabaya.

A. Isolasi Enzim Selulase dari Hepatopankreas Bekicot, *Achatina fulica*

Sebanyak 35 gram hepatopankreas bekicot dihomogenisasi dengan 500ml 1% NaCl dingin (pH=7) dalam waringblender selama 3 menit pada suhu 1-4°C. Homogenat yang diperoleh kemudian disaring melalui kain pada suhu 2-4°C dan filtratnya disentrifuge selama 80 menit pada suhu 2°C dan 4200 rpm dalam International Refrigerated Centrifuge dengan rotor no. 840. Supernatan yang diperoleh merupakan preparat enzim selulase selanjutnya dilakukan uji aktivitas dan kandungan proteinnya. (Soedigdo, dkk., 1980)

B. karakterisasi enzim selulase

• Menentukan kondisi optimum aktivitas enzim selulase

pH Optimum

pH optimum ditentukan dengan cara sebagai berikut: disediakan beberapa larutan CMC 2% dalam bufer asetat dengan pH berbeda 4,5; 5,0; 5,16, 5,25 dan 5,5. Masing-masing larutan diambil 40 ml dan dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer 100 ml yang berbeda. Ke dalam masing-masing labu erlenmeyer ditambahkan 10 ml larutan enzim kemudian diinkubasi pada suhu optimum selama 1 jam dengan kecepatan 160 rpm.. Reaksi dihentikan dengan pemanasan selama 10 menit. Kadar Gula reduksi dalam hidrolisat selulosa ditentukan dengan menggunakan metode Semgy-Nelson.

Suhu Optimum

Suhu optimum dilakukan dengan cara sebagai berikut: Ke dalam 6 buah labu erlenmeyer 100ml dimasukkan masing-masing 40 ml CMC 2% dalam larutan buffer asetat pH 5 dan ditambahkan 10 ml enzim selulase. Campuran dalam labu diinkubasi pada suhu berbeda (30°C, 40°C, 50°C dan 60°C) dan kecepatan 160 rpm selama 60 menit.. reaksi dihentikan dengan pemanasan selama 10 menit. Kadar Gula

reduksi dalam hidrolisis *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) ditentukan dengan menggunakan metode Semgy-Nelson.

Konsentrasi Substrat optimum

Konsentrasi substrat optimum ditentukan dengan cara sebagai berikut: disediakan larutan CMC dalam larutan buffer asetat pH 5 dengan konsentrasi yang berbeda dan dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer 100ml masing-masing sebanyak 40ml. Selanjutnya ditambahkan 10ml larutan enzim. Campuran diinkubasi pada suhu 50°C selama 1 jam. Sesudah reaksi enzimatik dihentikan dengan pemanasan, ditentukan kadar gula reduksinya dengan menggunakan metode Somogy-Nelson.

• Menentukan Parameter Kinetik Reaksi Enzimatik

Parameter kinetik reaksi enzimatik adalah laju reaksi maksimum (V_m) dan tetapan *Michaelis-Menten* (K_m), ditentukan dengan menggunakan persamaan *Michelis Menten* atau persamaan *Lineweaver Burk*. Persamaan *Michelis Menten* diperoleh dengan membuat kurva hubungan $[S]$ dengan V , sedangkan persamaan *Lineweaver Burk* diperoleh dengan membuat kurva hubungan $1/[S]$ dengan $1/V$. Data laju reaksi (V) diperoleh dari percobaan optimasi substrat.

C. Metode Analisis

Uji aktivitas Selulase

Pada tabung reaksi ditutup diisi dengan 1,0ml larutan buffer asetat pH 4,8 dan 0,5ml larutan enzim dalam buffer asetat. Selanjutnya campuran tersebut dipanaskan. Pada saat suhu mencapai 50°C, ke dalam tabung

D. Diagram Alir Percobaan

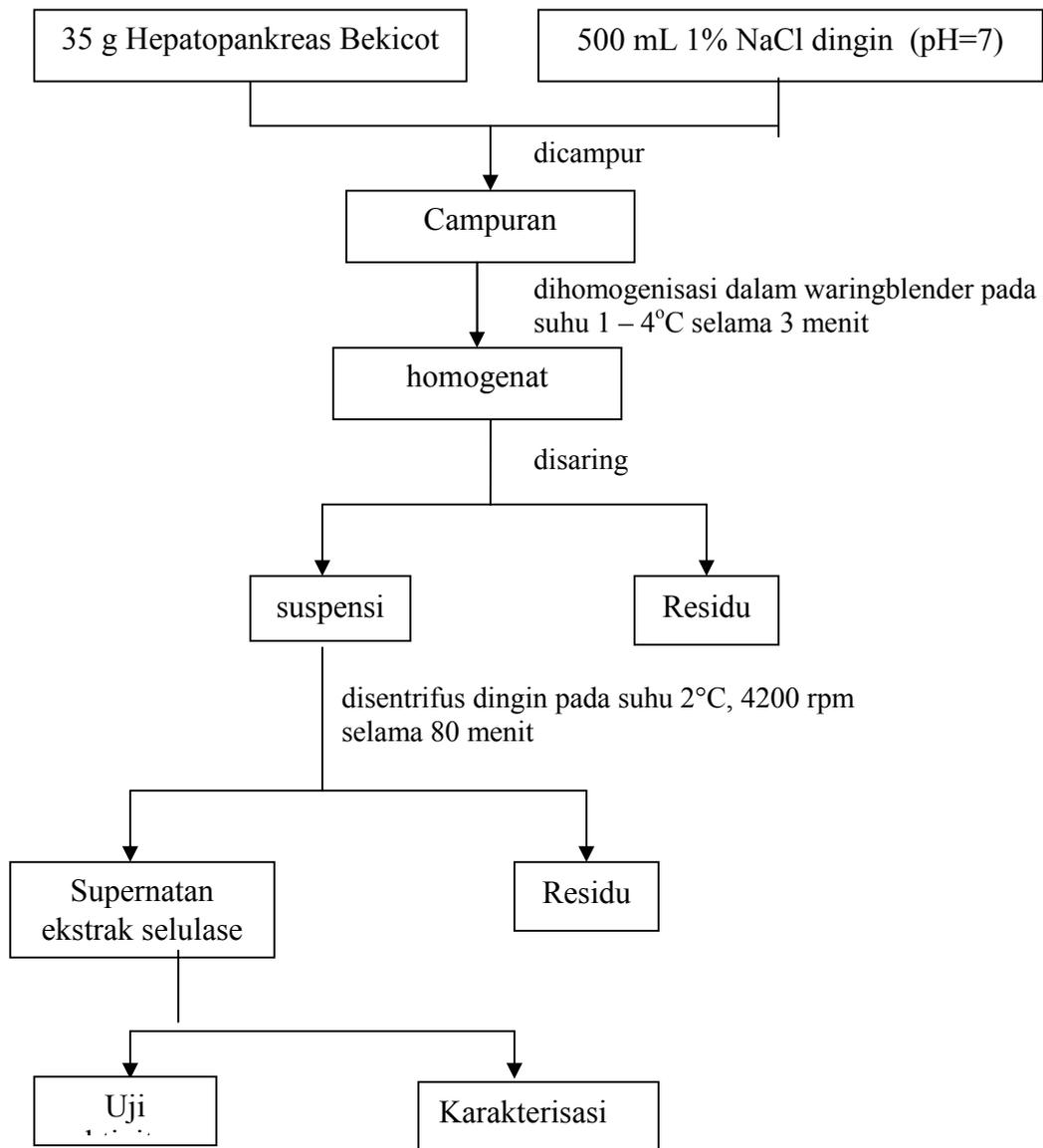
tersebut dimasukkan kertas saring berukuran 1,0 x 6,0 cm (~ 50 mg) lalu diaduk (NB. Semua bagian kertas saring Whatman No 1 harus tercelup dalam cairan). Setelah 1 jam reaksi dihentikan dengan pemanasan dalam air mendidih selama 10 menit dan selanjutnya dilakukan uji gula reduksi pada filtratnya dengan menggunakan metode Somogy-Nelson. (Ghose,1987)

Analisa Kadar Gula Reduksi

Pengambilan sampel dilakukan dengan menggunakan pipet mikro sebanyak 200 μ l, dimasukkan secara kuantitatif ke dalam tabung ependorf. Kemudian disentrifugasi kecepatan tinggi selama 5 menit. Dipisahkan antara residu dan filtratnya. Filtrat ditentukan kadar glukosanya dengan metode Somogyi-Nelson. Absorbansi sampel (y) diekstrapolasikan pada persamaan regresi linier yang telah didapat, dari kurva standar glukosa, sehingga setiap kadar glukosa dapat ditentukan..

Uji Kandungan Protein pada Enzim Selulase

Enzim selulase yang diisolasi dari hepatopankreas bekicot ditrentukan kadar proteinnya dengan cara sebagai berikut: ke dalam tabung reaksi yang berisi 7 mL ekstrak kasar enzim ditambahkan 3 ml reagen Bradford, lalu diinkubasi selama 5 menit. Setelah waktu inkubasi, absorbansi larutan enzim diukur pada panjang gelombang maksimum 595 nm. Absorbansi yang diperoleh diplotkan pada persamaan regresi linier kurva standar protein



HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Eksatraksi Enzim Selulase dari Hepatopankreas Bekicot, *Achatina fulica*

Bekicot (*Achatina fulica*) memiliki ciri khas warna garis-garis pada tempurung/cangkangnya tidak begitu mencolok sebagaimana gambar 4.1. Hewan ini menggantungkan hidupnya pada selulosa sebagai sumber energinya. Oleh karena itu banyak ditemukan mikroba selulolitik di dalam sistem pencernaannya. Enzim selulase merupakan enzim ekstraselular yang diproduksi di dalam sel mikroba selulolitik dan kemudian dikeluarkan dari sel masuk ke dalam sistem pencernaan untuk mencerna selulase. Dengan demikian enzim selulase diisolasi dari hepatopankreas bekicot (*Achatina fulica*) yang bermuara pada sistem pencernaan.

Sel hewan tidak memiliki dinding sel sehingga proses isolasi enzim berlangsung lebih mudah. Proses isolasi enzim selulase dari hepatopankreas melalui tahapan destruksi sel yaitu pelepasan enzim dari matriks sel. Enzim selulase dipisahkan dari matriks sel dengan cara merusak membran sel melalui pengaturan tekanan osmosa larutan diluar sel dengan menggunakan larutan NaCl dan homogenisasi dengan menggunakan *waringblender*

(Palmer, 1995). Homogenat yang diperoleh dari proses destruksi disaring dan disentrifus dengan tujuan untuk memisahkan enzim selulase dari matriks sel yang lain. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim selulase, berwarna coklat muda (gambar 2) dan sebanyak 470 mL

dari 500 mL homogenat (35 gram hepatopankreas) dan pH 5,2. Selanjutnya ekstrak kasar tersebut diuji kadar proteinnya dengan menggunakan metode *Bradford*. Metode ini didasarkan pada



Larutan kompleks biru ini diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm. Semakin tinggi Absorbansi yang terukur maka semakin tinggi kadar proteinnya. Kandungan protein dalam ekstrak kasar enzim selulase sebesar 1,72 mg per mL ekstrak enzim selulase. Kandungan protein ini jauh lebih rendah dibandingkan hasil penelitian yang dilaporkan Saryono (1991), bahwa enzim selulase yang



Gambar 1. Bekicot, *Achatina fulica*

Keberhasilan isolasi enzim selulase ditentukan melalui uji aktivitas enzim dengan menggunakan substrat kertas saring whatman no 1. Aktivitas yang terukur merupakan aktivitas selulosa total (FP-ase). Kadar glukosa sebagai hasil aktivitas enzim selulase ditentukan dengan metode Somogyi-Nelson. Metode ini didasarkan pada reaksi reduksi tembaga (II) menjadi tembaga (I) dalam larutan yang mengandung K-Na tartrat, yang kemudian oleh adanya reagen arsenomolibdat hasil ini membentuk senyawa kompleks berwarna biru. Larutan kompleks biru ini diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Ekstrak enzim selulase dari bekicot memiliki aktivitas selulase total (*Filter Paper Ase*) sebesar 0,020 μmol glukosa /mL substrat per menit atau 0,02 Unit dan aktivitas spesifik sebesar 0,023 Unit/mg protein.

1 Unit Aktivitas : banyaknya enzim yang dapat menghasilkan 1 μmol

reaksi antara reagen *Bradford* dengan protein sehingga terbentuk senyawa kompleks berwarna biru menurut reaksi berikut:

diekstrak dari bekicot (*Achatina fulica*) memiliki kandungan protein sebesar 4,4 mg/mL ekstrak. Hal ini kemungkinan karena ekstrak enzim yang dihasilkan pada penelitian ini terlalu encer (gambar.2) dan tidak dilakukan proses pemekatan sebagaimana yang telah dilakukan Saryono (1991). Pemekatan ekstrak enzim dilakukan melalui proses liofilisasi dengan tujuan untuk mengurangi pelarut pada kondisi suhu -87°C dan tekanan 1,3 bar.



Gambar 2. Ekstrak Kasar Enzim Selulase

glukosa per mililiter substrat tiap menit pada kondisi percobaan.

Hasil Aktivitas enzim selulase ini berbeda dengan hasil penelitian yang telah dilaporkan Saryono (1991), bahwa aktivitas enzim selulase terhadap selulase ampas nanas mencapai 3,4 mg/mL per menit dan aktivitas spesifik sebesar 0,7727 Unit/mg protein. Hal ini terjadi karena Saryono (1991) melakukan tahap pemurnian terhadap ekstrak enzim selulase setelah tahap liofilisasi. Pemurnian dilakukan melalui tahap fraksinasi dan dialisis dengan tujuan untuk menghilangkan semua komponen non protein yang masih tersisa dalam larutan.

Oleh karena itu perlu dilakukan tahap liofilisasi dan pemurnian terlebih dahulu terhadap ekstrak kasar enzim selulase sebelum melakukan proses hidrolisis selulosa secara enzimatik.

B. Karakterisasi Enzim Selulase

- Penentuan Kondisi Optimum Aktivitas Enzim Selulase

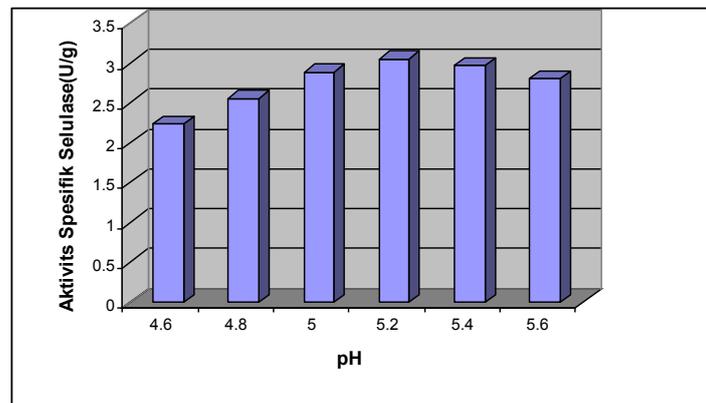
Aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain pH, temperatur dan konsentrasi substrat. Untuk mengetahui aktivitas optimum, maka dilakukan pengukuran aktivitas dengan kondisi yang bervariasi.

pH Optimum

Enzim memiliki pH optimum yang karakteristik, yaitu pH yang dapat menghasilkan aktivitas maksimal dalam mengkatalisis suatu reaksi. Perubahan pH berpengaruh terhadap aktivitas enzim melalui perubahan struktur atau muatan residu asam amino yang berfungsi dalam pengikatan substrat

pH yang bervariasi juga dapat menyebabkan perubahan konformasi enzim. Hal ini terjadi karena gugus bermuatan ($-NH_3^+$ atau $-COO^-$) yang jauh dari daerah terikatnya substrat, yang mungkin diperlukan untuk mempertahankan struktur tersier, akan mengalami perubahan muatan pada pH yang berbeda. Hal ini akan menyebabkan terganggunya ikatan ionik dan terputusnya folding maksimum enzim sehingga konformasi enzim berubah. Perubahan konformasi enzim akan menyebabkan aktivitas enzim menjadi menurun.

Gambar 3. menunjukkan bahwa aktivitas optimum ekstrak kasar enzim selulase berlangsung pada pH optimum, yaitu pH 5,2 dengan aktivitas sebesar 0,053 Unit dan aktivitas spesifik 0,003 U/mg dengan kadar glukosa sebesar 0,57 mg/mL substrat (28 mg glukosa/g CMC). pH optimum ini sesuai dengan hasil penelitian yang telah dilaporkan Saryono(1999), bahwa aktivitas optimum enzim selulase dalam menghidrolisis limbah nanas berlangsung pada pH 5,2. Enzim selulase masih bisa beraktivitas pada pH diatas dan dibawah pH 5,2 tetapi aktivitasnya lebih rendah. Hal ini kemungkinan karena terjadi perubahan muatan gugus fungsi residu asam amino pada enzim, terutama asam amino jenis asam glutamat(Bhat, 1997). Disamping itu konformasi enzim dimungkinkan juga telah mengalami perubahan konformasi (denaturasi) akibat perubahan pH yang bervariasi.



Gambar 3. Kurva Pengaruh pH terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Selulase

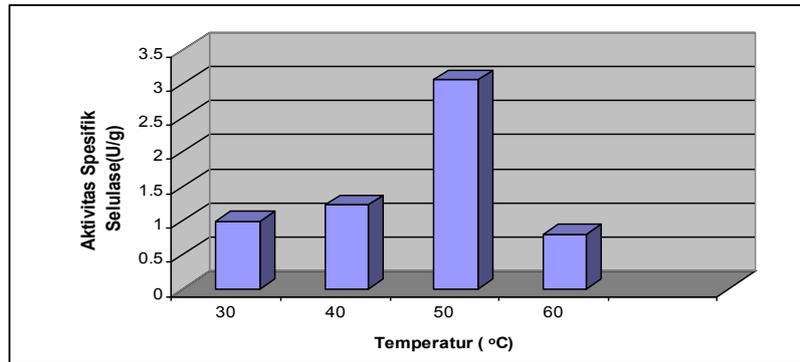
Temperatur Optimum

Pada temperatur optimum reaksi enzimatik berlangsung paling cepat karena aktivitas enzim maksimum. Peningkatan temperatur menyebabkan aktivitas ekstrak kasar enzim meningkat. Hal ini disebabkan oleh temperatur yang makin tinggi akan meningkatkan energi kinetik, sehingga menambah intensitas tumbukan antara substrat dengan enzim. Pada temperatur optimum, tumbukan

antara enzim dan substrat sangat efektif, sehingga pembentukan kompleks enzim-substrat makin mudah dan produk yang terbentuk meningkat. Di atas temperatur optimum enzim akan mengalami denaturasi dan kehilangan aktivitas katalitiknya (inaktivasi). Proses inaktivasi enzim pada temperatur yang sangat tinggi berlangsung melalui 2 tahap yaitu diawali dengan pembukaan parsial struktur sekunder, tersier dan atau

kuartener molekul enzim akibat putusnya ikatan-ikatan kovalen maupun ikatan hidrofobik dan selanjutnya terjadi

perubahan struktur primer enzim karena adanya kerusakan asam-asam amino tertentu oleh pemanasan.



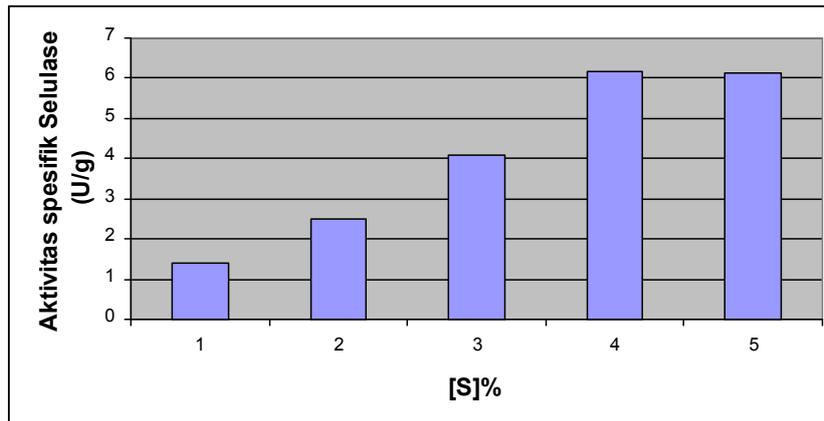
Gambar 4. Kurva Pengaruh Temperatur terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Selulase

Gambar 4 menunjukkan bahwa aktivitas optimum ekstrak kasar enzim selulase dicapai pada temperatur 50°C, dengan aktivitas 0,053 Unit (0,053 µmol glukosa/mL substrat per menit) dan aktivitas spesifik 0,0031 U/mg dengan kadar glukosa sebesar 56,77 mg/100mL (28,39 mg glukosa/g CMC). Temperatur optimum ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Sreenath (2002), yang melaporkan bahwa aktivitas optimum enzim selulase dari *Trichoderma viridae* dan *Aspergillus niger* dalam menghidrolisis *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) berlangsung pada suhu 50°C. Kondisi ini berbeda dengan hasil penelitian yang telah dilaporkan Saryono (1991) dan Maisaroh (2009). Aktivitas optimum selulase terhadap selulosa ampas nanas berlangsung pada temperatur optimum 37°C (Saryono, 1991) sedangkan terhadap selulosa ampas tebu (bagas) pada temperatur 40°C (Maisaroh, 2009). Perbedaan temperatur optimum ini kemungkinan karena *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) memiliki viskositas yang lebih tinggi dibandingkan selulosa yang lain pada konsentrasi yang sama (2 %), sehingga enzim selulosa membutuhkan energi yang cukup tinggi untuk membentuk kompleks dengan substrat *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC). Oleh karena itu untuk memperoleh data yang akurat perlu dilakukan penelitian tentang pengaruh

variasi substrat terhadap temperatur optimum aktivitas enzim selulase.

Konsentrasi Substrat Optimum

Konsentrasi substrat merupakan salah satu faktor yang dapat mempengaruhi aktivitas enzim. Gambar 4.5. menunjukkan bahwa konsentrasi substrat sebanding dengan aktivitas ekstrak kasar enzim. Pada konsentrasi substrat rendah, aktivitas ekstrak kasar enzim juga rendah, karena sisi aktif enzim hanya sedikit mengikat substrat, sehingga produk gula pereduksi yang dihasilkan juga sedikit. Demikian juga dengan konsentrasi substrat yang makin tinggi, maka sisi aktif enzim akan makin banyak mengikat substrat, sehingga produk glukosa yang dihasilkan juga makin banyak. Penambahan substrat lebih lanjut hanya sedikit meningkatkan aktivitas ekstrak kasar enzim, karena hampir semua enzim telah membentuk kompleks enzim-substrat, sehingga tidak terdapat lagi sisi aktif enzim yang bebas.



Gambar 5. Kurva Hubungan Konsentrasi Substrat terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar Selulase

Pada konsentrasi substrat di atas 4% ternyata mulai terjadi penurunan kecepatan reaksi enzimatik. Hal ini terjadi karena semakin tinggi konsentrasi *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) maka makin tinggi viskositasnya sehingga probabilitas substrat berikatan dengan sisi aktif enzim semakin kecil. Dengan demikian aktivitas optimum berlangsung pada konsentrasi substrat 4%. Data yang diperoleh dari optimasi substrat ini digunakan untuk menentukan parameter kinetik enzim selulase yang meliputi V_m (Kecepatan Reaksi Maksimum) dan K_m (Konstanta *Michaelis-Menten*)

• **Penentuan Parameter Kinetika Reaksi Enzimatik**

V_m merupakan kecepatan maksimum yaitu kecepatan yang berangsur-angsur dicapai pada konsentrasi substrat tinggi (enzim telah jenuh dengan substrat) sedangkan K_m merupakan konstanta yang menyatakan

konsentrasi substrat pada saat kecepatan reaksi mencapai setengah kali kecepatan maksimum.

Harga V_m dan K_m dapat ditentukan dengan membuat grafik antara $1/V$ dengan $1/[S]$.

Persamaan *Michaelis-Menten*:

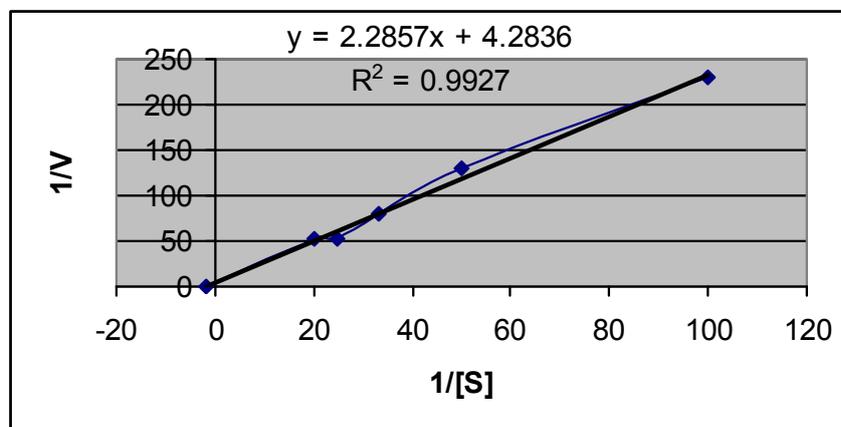
$$V_m = \frac{V_m \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Dapat dinyatakan sebagai berikut:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m + [S]}{V_m \cdot [S]} \quad \text{atau}$$

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_m} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m}$$

Dari persamaan di atas terlihat bahwa $1/V$ adalah fungsi dari $1/[S]$. Dengan demikian jika dibuat kurva hubungan antara $1/V$ dengan $1/[S]$, akan terbentuk garis lurus (gambar 6).



Gambar 6. Kurva Hubungan $1/V$ dengan $1/[S]$

Ekstrak kasar enzim selulase yang diisolasi dari bekicot (*Achatina fulica*) memiliki harga V_m sebesar 0,002 mg/mL per menit dan K_m sebesar 0,005 mg/mL. Parameter kinetik ini berbeda dengan hasil penelitian yang telah dilaporkan Saryono (1991), bahwa enzim selulase dari bekicot dengan menggunakan substrat suspensi ampas nanas dalam buffer asetat pH 5,2 mempunyai harga K_m 0,014 mg glukosa/mL dan nilai V_m sebesar 0,025 mg/mL/menit. Perbedaan nilai parameter kinetik ini dimungkinkan karena substrat yang digunakan berbeda. Setengah kecepatan maksimum enzim selulase dari bekicot (*Achatina fulica*) tercapai pada konsentrasi substrat *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) lebih tinggi dibandingkan substrat ampas nanas.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa

1. Enzim selulase yang diisolasi dari bekicot (*Achatina fulica*) bekerja optimum pada pH 5,2, temperatur 50°C, dan konsentrasi substrat 4%
2. Aktivitas enzim selulase dari bekicot (*Achatina fulica*) terhadap *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) sebesar 0,02 $\mu\text{mol/mL}$ per menit (0,02 Unit) sedangkan kandungan proteinnya 1,72 mg/mL enzim sehingga aktivitas spesifiknya sebesar 0,023 Unit/mg protein
3. Karakterisasi enzim selulase dari bekicot dengan menggunakan substrat CMC dalam buffer asetat pH 5,2 mempunyai harga V_m sebesar 0,23mg/mL per menit dan K_m sebesar 0,53 mg/mL

Saran

1. untuk meningkatkan kandungan protein dan aktivitas ekstrak kasar enzim selulase dari bekicot (*Achatina fulica*) maka perlu dilakukan tahapan liofilisasi dan pemurnian.
2. perlu dilakukan penelitian lanjut mengenai pengaruh variasi substrat terhadap temperatur optimum aktivitas enzim selulase..

DAFTAR PUSTAKA

- Bhat, M.K., (1997), *Cellulose Degrading Enzymes and Their Potential Industrial Applications*, Food Macromolecul Science Departement, Institute pf Food Research. Biotechnology Advances. Vol.15. 583-620
- Bradford MM, 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254
- Ghose, T.K., (1987), *Measurement of Cellulase activities*, *Pure and Applied Chemistry*, 59, 257-268
- Indra, D., K.Ramalingam, and Mary Babu., (2005), *Isolation, Purification and Characterization of Collagenase from Hepatopancreas of The Snail Achatian fulica*, *Comparative Biochemistry and Physiology* 142, 1-7
- Koolman, J. dan Rohm, K.(2001), *Atlas Berwarna dan Teks Biokimia*, Terjemahan Septelia, Penerbit Hipokrates , Jakarta
- Lee,Y.J., *et al.* (2008), “Purification and Characterization of Cellulase Produced by *Bacillus amyoliquefaciens* DL-3 Utilizing Rice Hull”, *Bioresource Technology*, vol. 99 hal. 378–386
- Soedigdo, P., L.S.Nio, A. Soekeni,R.C. Barnett, (1970), *Cellulase from The Snail Achatina fulica* (Fer), *Physial Zoology*, 43,2,139-144
- Soedigdo, P., Muliawati, M. Wirahadikusumah, (1980), *Penuntun Praktikum Biokimia Dasar, edisi kedua*, Departemen Kimia FMIPA ITB, Bandung.

Silaban, Ramlan., (1999), *Enzim Selulolitik pada Bakteri Pseudomonas alchaligenes PaAf-18*, PhD Theses from JBPTITBPP, Bandung

Sudarmadji, S., Haryono,B., Harsono., (1984), *Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian*, Liberti, Yogyakarta

Duff, S.J.B., Murray, W.D., (1996), *Bioconversion of forest products industry waste cellulosics to fuel ethanol: a review*. *Bioresour. Technol.* 55, 1 – 33.

