

Isolasi dan Karakterisasi Enzim Selulase dari Keong Sawah *Pila ampullacea* Menggunakan Substrat Serbuk Gergaji Kayu

Hasty Hamzah

Program Studi DIII Farmasi Politeknik Bau-bau, Sulawesi Tenggara 93724

Abstrak

Enzim selulase adalah enzim yang berperan dalam katalisis reaksi hidrolisis selulosa menjadi glukosa. Enzim ini dapat diisolasi dari keong sawah *Pila ampullacea* menggunakan substrat selulosa alami dari serbuk gergaji kayu. Tujuan penelitian ini adalah mengisolasi dan menentukan kondisi optimum selulase dari keong sawah. Penelitian diawali dengan persiapan substrat serbuk gergaji dengan cara delignifikasi menggunakan NaOH 2%. Selanjutnya mengisolasi enzim selulase dari hepatopankreas keong sawah melalui teknik destruksi, homogenisasi dan sentrifugasi. Penelitian dilanjutkan untuk memurnikan selulase melalui pengendapan protein selulase menggunakan amonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pada berbagai tingkat kejenuhan 10%, 20%, 30%, 40%, 60%, 80%. Pemurnian tahap berikutnya dilakukan dengan cara dialisis menggunakan membran selofan. Aktivitas selulase diperoleh dengan menghitung kadar glukosa sebagai produk hidrolisis dari substrat selulosa (serbuk gergaji) menggunakan metode Nelson-Somogy, sedangkan kadar protein ditentukan dengan metode Lowry dengan menggunakan *bovine serum albumin* (BSA) sebagai standar. Enzim selulase dari keong sawah mencapai aktivitas maksimum pada kondisi optimum: konsentrasi substrat (serbuk gergaji) 2% (b/v), pH 5,8, suhu 40 °C, konsentrasi enzim 7,2 mg/mL.

Kata Kunci: Selulase, keong sawah, *Pila ampullacea*, serbuk gergaji, isolasi, karakterisasi

1. Pendahuluan

Kemajuan bioteknologi telah meningkatkan pendayagunaan enzim selulase, baik dari diversifikasi pemanfaatannya maupun dalam skala penggunaannya. Selulase adalah kompleks enzim yang menghidrolisis secara sinergis selulosa menjadi selobiosa (disakarida), kemudian dihidrolisis lebih lanjut oleh enzim selobiase menghasilkan glukosa [1]. Selulase memainkan peranan penting dalam proses biodegradasi biomassa lignoselulosa, dimana selulosa dapat dikonversi menjadi glukosa [2], dan jika difermentasi lebih lanjut akan menghasilkan etanol, butanol, serta aseton. Produk fermentasi tersebut dapat dimanfaatkan sebagai *biofuel* (bahan bakar *renewable*), untuk mengurangi penggunaan bahan bakar fosil dan mengurangi polusi lingkungan [3]. Enzim tersebut juga telah digunakan dalam bidang produksi pangan, tekstil, asam-asam organik, etanol, kertas, penanganan limbah, dan analisis biokimia [4]. Di sisi lain, enzim selulase memiliki nilai ekonomi yang tinggi dan prospek penjualan yang cukup besar pada pasar global [5]. Besarnya potensi enzim selulase menjadikan permintaan terhadap enzim ini meningkat pesat. Oleh karena itu, para ilmuwan terus melakukan

riset untuk memperoleh sumber selulase baru serta terus melakukan inovasi teknologi enzimatisnya.

Berdasarkan peran enzim selulase dalam mengkatalisis reaksi hidrolisis selulosa, maka enzim ini dapat dimanfaatkan untuk menghidrolisis selulosa yang terkandung dalam serbuk gergaji kayu (*saw dust*). Serbuk gergaji sebagai hasil industri pengolahan kayu merupakan limbah lignoselulosa yang mengandung 42-45% selulosa dan 27-30% hemiselulosa [6]. Tingginya kadar selulosa pada serbuk gergaji dapat dimanfaatkan sebagai salah satu sumber selulosa alamiah. Serbuk gergaji ini sangat berpotensi maksimal untuk produksi selulase secara komersial bagi semua organisme [7, 8]. Enzim selulase sekaligus berperan sebagai biokonverter limbah selulosa (khususnya serbuk gergaji) yang cukup melimpah untuk mengatasi masalah lingkungan [9].

Enzim selulase dapat diisolasi dari mikroorganisme, hewan, tumbuhan. Telah banyak dilaporkan bahwa selulase dapat diisolasi dari hewan tingkat rendah seperti moluska, antara lain keong *Mudalia dilatata* [10], (Farrisdkk., 1994), keong mas *Pomacea canaliculata* [11], bekicot *Achatina fulica* [12, 13], siput air tawar

*Email: hastyhamzah@gmail.com

Ampullaria crossean [14], dan keong afrika *Archatina marginata* [15].

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi selulase dari salah satu jenis keong lain yakni keong sawah. Genus *Pila* merupakan keong pemakan tumbuhan utamanya berupa daun tumbuhan air yang mengandung selulosa dan dimanfaatkan sebagai sumber energinya [16]. Proses pencernaan selulosa dalam sistem digestif (pencernaan) hewan invertebrata termasuk keong sawah merepresentasikan adanya simbiosis enzim selulase dengan bakteri atau mikroorganisme lain [17]. Mikroorganisme selulolitik memproduksi enzim selulase (secara intraseluler) untuk mencerna makanan (selulosa) yang sebagian besar disimpan dalam hepatopankreas yang bermuara ke saluran pencernaan. Hal tersebut menunjukkan bahwa enzim selulase dapat diisolasi dari keong sawah *Pila ampullacea*.

Selain mengisolasi enzim selulase, penelitian ini juga bertujuan untuk menentukan kondisi optimum enzim selulase (konsentrasi substrat, pH, suhu dan konsentrasi enzim). Kondisi optimum selulase perlu diketahui agar aktivitas enzim dapat dicapai maksimal dalam menghidrolisis substrat serbuk gergaji menjadi glukosa

2. Bahan dan Metode

2.1 Persiapan bahan baku dan delignifikasi

Serbuk gergaji kayu dicuci dengan air kemudian dijemur sampai kering selanjutnya dihaluskan dengan blender kemudian diayak dengan ayakan ukuran 100 mesh. Proses delignifikasi dilakukan dengan mencampur serbuk gergaji kayu 100 mesh dengan larutan natrium hidroksida (NaOH) untuk meningkatkan hasil hidrolisis [18]. Campuran serbuk gergaji dan larutan NaOH 2% b/v dimasukkan ke dalam wadah tertutup, dipanaskan pada suhu 121 °C dan dibiarkan selama 30 menit sambil sesekali diaduk lalu disaring dengan kain penyaring. Residu dicuci dengan akuades hingga lignin yang berwarna coklat kehitaman keluar. Proses pencucian dihentikan setelah cairan pencuci sudah jernih dan pH netral, kemudian sampel dikeringkan dalam oven pada suhu 45°C hingga kering [10, 19]. Kadar selulosa sebelum dan setelah delignifikasi ditentukan dengan metode Chesson [20].

2.2 Isolasi dan Pemurnian Enzim Selulase

Sebanyak 75 g hepatopankreas keong sawah dihomogenisasi dengan 500 mL NaCl 1% (pH = 7) dingin dalam blender selama 3 menit. Homogenat yang diperoleh disaring dengan kain steril. Kemudian residu dibuang sedangkan filtratnya disentrifugasi selama 30 menit pada suhu 2-4 °C dengan kecepatan 6000 *rotation*

per minute (rpm), supernatan yang dihasilkan merupakan enzim selulase kasar (ekstrak enzim). Ekstrak kasar selulase selanjutnya dimurnikan dengan teknik fraksinasi melalui presipitasi (pengendapan) protein enzim menggunakan garam amonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pada berbagai tingkat kejenuhan 10%, 20%, 30%, 40%, 60% hingga 80%. Fraksi dengan aktivitas selulase tertinggi dimurnikan lebih lanjut, dan sisa garam amonium sulfat dihilangkan melalui teknik dialisis menggunakan membran selofan dalam buffer sitrat fosfat. Selulase murni digunakan untuk karakterisasi selanjutnya.

2.3 Uji Aktivitas Enzim dan Penentuan Kadar Protein

Penentuan aktivitas enzim ditentukan berdasarkan jumlah glukosa yang dihasilkan selama 60 menit inkubasi dengan konsentrasi substrat serbuk kayu 2%, pH 5,6 dan suhu 37°C. Jumlah glukosa bebas yang dihasilkan ditentukan dengan menggunakan spektrofotometer berdasarkan metode Nelson-Somogy. Kadar protein ditentukan dengan metode Lowry, dimana larutan diukur dengan spektrofotometer spektronik 20D pada panjang gelombang maksimum, dan kadar proteinnya ditentukan berdasarkan kurva standar *bovine serum albumin* (BSA).

2.4 Karakterisasi enzim selulase

Karakterisasi dilakukan untuk menentukan kondisi optimum enzim selulase sehingga diperoleh aktivitas maksimum. Kondisi optimum meliputi penentuan konsentrasi substrat (serbuk gergaji hasil delignifikasi), pH, suhu dan konsentrasi enzim. Pada penentuan konsentrasi substrat, substrat divariasikan 0,5%; 1%; 1,5%; 2%; 2,5% dan 3%, sedangkan suhu bervariasi pada suhu 30 °C; 35 °C; 40 °C; 45 °C dan 50 °C. Pengaruh pH terhadap aktivitas selulase menggunakan buffer sitrat fosfat pada rentang pH 5,2; 5,4; 5,6; 5,8; 6,0; 6,2 dan penentuan konsentrasi enzim dilakukan pada variasi 1,8 mg/mL; 3,6 mg/mL; 5,4 mg/mL; 6,0 mg/mL; 7,2 mg/mL; 9,0 mg/mL; 10,8 mg/mL.

3. Hasil

3.1 Penentuan Kadar Selulosa Sebelum dan Setelah Delignifikasi

Analisis kadar selulosa menggunakan metode Chesson menunjukkan bahwa dalam substrat serbuk gergaji sebelum delignifikasi adalah 16,69% sedangkan setelah delignifikasi meningkat sebesar 26,97% (Tabel 1).

Tabel 1. Penentuan kadar selulosa serbuk gergaji sebelum dan setelah proses delignifikasi

Serbuk gergaji	Berat sampel (a) (g)	Berat residu (c) (g)	Berat residu (d) (g)	Kadar selulosa (%)
A	1,0017	0,7447	0,5788	16,6882
B	1,0014	0,9616	0,6928	26,9769

A: Tidak terdelignifikasi

B: Terdelignifikasi

3.2 Isolasi dan pemurnian enzim

Isolasi enzim yang dilakukan melalui destruksi, homogenisasi dan sentrifugasi sel hepatopankreas keong sawah menghasilkan ekstrak selulase (*crude*) dengan aktivitas rendah. Oleh karena itu dilakukan pemurnian dengan cara presipitasi protein enzim menggunakan amonium sulfat. Untuk mengetahui tingkat kejenuhan optimum protein enzim dilakukan fraksinasi mulai 10%, 20%, 30%, 40%, 60% dan 80%.

Tabel 2. Aktivitas tiap tingkat kejenuhan amonium sulfat

Fraksi (%)	[Glukosa] (mg/mL)	Aktivitas (U/mL)	Kadar Protein (mg/mL)
0-10	0,3073	0,0285	18,5662
0-20	0,1779	0,0165	23,1252
20-30	0,0226	0,0021	6,37595
20-40	0,0449	0,0042	21,3413
40-60	0,0166	0,0015	17,7073
60-80	0,0101	0,0001	15,7251

Tabel 2 menunjukkan aktivitas dan kadar protein setiap fraksi. Enzim selulase pada fraksi 10% memiliki aktivitas tertinggi 0,0285 U/mL dan kadar protein 18,5662 mg/mL. Enzim pada fraksi ini, dimurnikan lebih lanjut dengan cara dialisis. Dalam setiap tahap pemurnian selulase dilakukan pengukuran kadar protein dan aktivitas spesifik selulase, sehingga dapat diketahui tingkat kemurnian pada setiap tahap pemurnian. Perbandingan aktivitas *crude* selulase, ditunjukkan oleh Tabel 3, dimana selulase hasil pemurnian menggunakan amonium sulfat 10% dan dialisis.

Tabel 3. Aktivitas dan kadar protein setiap tahap pemurnian

Fraksi Enzim	Kadar Glukosa (mg/mL)	Aktivitas (U/mL)	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas Spesifik (U/mg)	Tingkat Kemurnian
Ekstrak kasar	0,0751	0,0069	49,6861	0,00014	1
Fraksinasi 0-10%	0,2470	0,0229	18,5662	0,00123	8,803
Dialisis	0,4842	0,0448	17,5090	0,00256	18,296

Tabel 3 menunjukkan peningkatan aktivitas enzim dan penurunan kadar protein. Aktivitas enzim ekstrak kasar adalah 0,0069 U/mL dengan kadar protein 49,6861 mg/mL, aktivitas enzim meningkat pada fraksi amonium sulfat 10% adalah 0,0229 U/mL dengan kadar protein 18,5662 mg/mL, dan semakin meningkat untuk enzim hasil dialisis dengan aktivitas 0,0448 U/mL dan kadar protein semakin menurun hingga 17,5090 mg/mL.

3.3 Konsentrasi substrat optimum

Tabel 4. Aktivitas tiap tingkat kejenuhan amonium sulfat

[Substrat] %, b/v	Absorbansi	Kadar glukosa (mg/mL)*	Aktivitas (U/mL)
0,5	0,404	0,7668	0,0709
1,0	0,612	1,1777	0,1091
1,5	0,676	1,3043	0,1208
2,0	0,794	1,5380	0,1424
2,5	0,788	1,5257	0,1413
3,0	0,754	1,4585	0,1350

Ket: *) Pengenceran 20x

Tabel 4 memperlihatkan pengaruh peningkatan konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim. Aktivitas meningkat sebesar 0,0709 U/mL untuk konsentrasi 0,5% hingga 0,1424 U/mL pada konsentrasi 2%. Pada konsentrasi 2,5%, aktivitas enzim selulase cenderung tetap yakni 0,1413 U/mL. Dapat dikatakan bahwa aktivitas maksimum dicapai pada saat konsentrasi substrat 2%.

3.4 pH Optimum

Nilai pH optimum enzim selulase ditetapkan pada berbagai pH buffer sitrat fosfat yakni mulai pH 5,2 hingga pH 6,2. Hasil penelitian yang ditunjukkan pada Tabel 5, terlihat bahwa aktivitas meningkat dengan meningkatnya pH dari pH 5,2 hingga pH 5,6. Aktivitas selulase maksimum pada pH 5,8 yaitu sebesar 0,0436 U/mL. Pada nilai pH yang lebih tinggi 6,0 dan pH 6,2 aktivitas menurun tajam berturut-turut 0,0172 U/mL dan 0,0053 U/mL. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa pH optimum enzim selulase dari keong sawah pada substrat serbuk gergaji kayu adalah 5,8.

Tabel 5. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim

pH	Absorbansi	Kadar glukosa (mg/mL)*	Aktivitas (U/mL)
5,2	0,246	0,1136	0,0105
5,4	0,440	0,2095	0,0194
5,6	0,542	0,2599	0,0240
5,8	0,970	0,4713	0,0436
6,0	0,392	0,1858	0,0172
6,2	0,131	0,0568	0,0053

Ket: *) Pengenceran 5x

3.5 Suhu Optimum

Tabel 6 menggambarkan bahwa suhu berpengaruh secara signifikan terhadap aktivitas enzim selulase. Diketahui terjadi peningkatan aktivitas enzim selulase dari suhu dari 30 °C hingga suhu 40 °C. Pada suhu 30 °C aktivitas enzim selulase adalah sebesar 0,02 U/mL dan meningkat hingga 0,0472 U/mL pada suhu 40 °C dan kemudian menurun hingga 0,0269 U/mL pada suhu 50 °C. Dari data tersebut menunjukkan bahwa aktivitas optimum enzim dicapai pada suhu 40 °C dengan aktivitas 0,0472 U/mL (0,0472 μmol glukosa/ mL per menit).

Tabel 5. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim

Suhu (°C)	Absorbansi	Kadar Glukosa (mg/mL)*	Aktivitas (U/mL)
30	0,235	0,2164	0,02
35	0,27	0,2509	0,0232
40	0,532	0,5098	0,0472
45	0,376	0,3557	0,0329
50	0,311	0,2915	0,0269

Ket: *) Pengenceran 5x

3.6 Konsentrasi Enzim Optimum

Tabel 7 menunjukkan pengaruh konsentrasi enzim terhadap aktivitas selulase. Terlihat bahwa aktivitas enzim mulai konsentrasi 1,8 mg/mL masih cukup rendah sebesar 0,0033 U/mL. Aktivitas enzim semakin meningkat pada konsentrasi 3,6 mg/mL dengan aktivitas sebesar 0,0154 U/mL hingga 0,0608 U/mL pada konsentrasi 6 mg/mL. Pada kondisi ini konsentrasi enzim makin tinggi, sisi aktif enzim makin banyak mengikat substrat. Selanjutnya kenaikan konsentrasi enzim sampai 7,2 mg/mL menyebabkan aktivitas enzim meningkat menjadi 0,0977 U/mL. Penambahan enzim di atas konsentrasi tersebut tidak merubah aktivitas enzim secara signifikan walaupun terjadi sedikit penurunan maupun peningkatan aktivitas pada konsentrasi enzim 9 mg/mL dan 10,8 mg/mL. Hal ini mengindikasikan bahwa pada konsentrasi enzim 7,2 mg/mL aktivitas mencapai maksimum.

Tabel 7. Aktivitas Enzim terhadap variasi konsentrasi enzim

Konsentrasi (mg/mL)	Absorbansi	Kadar Glukosa (mg/mL)	Aktivitas (U/mL)
1,8	0,088	0,0356*	0,0033
3,6	0,100	0,1660**	0,0154
5,4	0,336	0,6324**	0,0586
6,0	0,348	0,6561**	0,0608
7,2	0,55	1,0435**	0,0977
9,0	0,54	1,0356**	0,0959
10,8	0,543	1,0553**	0,0966

Ket: *) Pengenceran 5x

**) Pengenceran 20x

4. Pembahasan

Bahan lignoselulosa sangat besar peranannya sebagai substrat enzim selulase dalam biokonversi selulosa menghasilkan glukosa. Serbuk gergaji kayu merupakan bahan lignoselulosa yang memiliki kandungan selulosa dan lignin yang besar. Untuk meningkatkan proses hidrolisis secara enzimatik maka perlu dilakukan perlakuan awal yang disebut proses delignifikasi dengan menggunakan bantuan senyawa katalis, salah satu caranya adalah dengan menggunakan katalis kimia berupa senyawa NaOH [21, 22]. Berdasarkan Tabel 1, serbuk gergaji yang telah melalui proses delignifikasi dengan NaOH memiliki kadar selulosa yang lebih tinggi. Hal ini terjadi karena banyaknya lignin yang hilang akibat terdegradasi oleh NaOH yang menyebabkan pula terjadinya safonifikasi ikatan ester dari residu lignin dan hemiselulosa menjadi lebih terbuka sehingga struktur selulosa lebih mudah untuk dihidrolisis oleh enzim dan menghasilkan glukosa yang maksimal.

Enzim selulase merupakan enzim ekstraselular yang diproduksi di dalam sel mikroba selulolitik dan kemudian dikeluarkan dari sel masuk ke dalam sistem pencernaan untuk mencerna selulosa. Proses isolasi 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 osmosis larutan diluar sel dengan menggunakan larutan NaCl dan homogenisasi dengan menggunakan blender. Selanjutnya homogenat disentrifugasi menghasilkan endapan dan supernatan. Endapan yang diperoleh dilarutkan dalam buffer sitrat fosfat pH 5,6. Hasil isolasi ini merupakan selulase kasar dengan aktivitas 0,0069 U/mL.

Pemurnian melalui fraksinasi dengan (NH₄)₂SO₄ dilakukan untuk meningkatkan aktivitas enzim pada tingkat kejenuhan 0-10%, 0-20%, 20-30%, 20-40%, 40-60%, dan 60-80% (Tabel 2). Penambahan garam netral (NH₄)₂SO₄ ke dalam larutan enzim pada tingkat

kejenuhan yang optimum akan meningkatkan muatan listrik di sekitar protein enzim, yang akan menarik mantel air dari molekul protein. Interaksi hidrofobik di antara sesama molekul protein pada suasana ionik tinggi akan menurunkan kelarutan protein, sehingga protein enzim mengendap. Enzim selulase yang diperoleh dari hasil presipitasi dengan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10% masih belum murni karena mengandung sisa-sisa garam $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sehingga perlu dilakukan cara dialisis. Batas akhir dialisis ditandai dengan tidak adanya endapan BaSO_4 ketika larutan buffer ditambahkan garam BaCl_2 . Lamanya waktu dialisis yang diperlukan adalah 9 jam. Setiap tahap pemurnian enzim selulase dilakukan pengukuran kadar protein dan aktivitas spesifik, sehingga dapat diketahui tingkat kemurnian pada setiap tahap pemurnian.

Tabel 3 menunjukkan bahwa pemurnian dengan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10% menghasilkan aktivitas spesifik selulase 0,00123 U/mg dengan tingkat kemurnian 8,803. Nilai ini meningkat dibandingkan aktivitas spesifik selulase kasar (0,00014 U/mg). Teknik dialisis dapat memisahkan molekul yang berukuran kecil (garam amonium sulfat) dari molekul yang berukuran besar yakni molekul enzim selulase melalui membran selofan. Hal ini ditandai dengan meningkatnya aktivitas spesifik selulase yaitu 0,00256 U/mg dengan tingkat kemurnian 18,296.

Aktivitas enzim meningkat sebesar 0,0709 U/mL untuk konsentrasi 0,5% hingga 0,1424 U/mL untuk konsentrasi 2% pada uji atau penentuan konsentrasi substrat (Tabel 4). Aktivitas enzim cenderung tetap pada konsentrasi 2,5% yakni 0,1413 U/mL. Hal ini disebabkan terjadinya kejenuhan dimana sisi aktif enzim selulase telah dipenuhi oleh substrat. Tingginya konsentrasi substrat tidak menyebabkan bertambahnya konsentrasi kompleks enzim substrat, bahkan penambahan konsentrasi substrat lebih lanjut justru menghambat kerja enzim karena substrat yang semakin banyak akan berdesakan satu sama lain berikatan dengan sisi aktif enzim. Akibatnya, stabilitas kompleks enzim substrat akan terganggu.

Enzim memiliki pH optimum yang khas, yaitu pH yang dapat menghasilkan aktivitas maksimum 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 yakni $-\text{NH}_3^+$ atau $-\text{COO}^-$ yang jauh dari daerah terikatnya substrat yang mungkin diperlukan untuk mempertahankan struktur tersier akan mengalami perubahan muatan pada pH yang berbeda. Hal ini menyebabkan terganggunya ikatan ionik dan terputusnya ikatan enzim dengan substrat (*folded*) sehingga konformasi enzim berubah. Perubahan inilah

yang menyebabkan aktivitas enzim menurun. pH optimum selulase dalam penelitian ini berada pada kisaran pH optimum dari beberapa penelitian sebelumnya. Li *et al* (2009) meneliti selulase dari lambung siput *Ampullariacrossean* pada pH optimum berkisar 5,5 – 6,5 [14].

Perubahan suhu terhadap aktivitas enzim memberikan pengaruh signifikan. Reaksi enzimatik berlangsung paling cepat pada suhu optimum karena aktivitas enzim titik maksimum. Peningkatan suhu dari 30°C hingga 35°C menyebabkan aktivitas enzim meningkat. Kenaikan suhu optimum pada suhu 40°C menyebabkan peningkatan energi kinetik sehingga menambah intensitas tumbukan antara substrat dengan enzim dan produk yang terbentuk lebih maksimal. Di atas suhu optimum, enzim akan mengalami denaturasi dan kehilangan aktivitas katalitiknya (inaktivasi), ditunjukkan dengan menurunnya aktivitas pada suhu 45°C dan 50°C. Proses inaktivasi enzim pada temperatur yang sangat tinggi berlangsung melalui 2 tahap yaitu diawali dengan pembukaan parsial struktur sekunder, tersier, dan kuaterner molekul enzim akibat putusannya ikatan-ikatan kovalen maupun ikatan hidrofobik dan selanjutnya terjadi perubahan struktur primer enzim karena adanya kerusakan asam-asam amino tertentu akibat pemanasan. Suhu optimum ini sesuai dengan penelitian mengenai enzim selulase yang diisolasi dari udang *Cherax quadrinatus* dan kumbang merah *Tribolium castaneum* [3]. Di sisi lain, penelitian lainnya menunjukkan hasil bahwa selulase (Hgccl) dari *Hirondellea gigas* secara efisien dapat memproduksi glukosa dari substrat kayu kering pada suhu 35 °C [23].

Kecepatan suatu reaksi yang menggunakan enzim tergantung pada konsentrasi enzim tersebut. Pada konsentrasi substrat tertentu, kecepatan reaksi bertambah dengan bertambahnya konsentrasi enzim. Tetapi setelah mencapai aktivitas maksimumnya, maka penambahan konsentrasi enzim tidak akan mengubah aktivitas enzim. Terlihat bahwa aktivitas enzim mulai konsentrasi 1,8 mg/mL masih cukup rendah sebesar 0,0033 U/mL. Aktivitas enzim semakin meningkat pada konsentrasi 3,6 mg/mL dengan aktivitas sebesar 0,0154 U/mL hingga 0,0608 U/mL pada konsentrasi 6 mg/mL. Selanjutnya kenaikan konsentrasi enzim sampai 7,2 mg/mL menyebabkan aktivitas enzim meningkat menjadi 0,0977 U/mL. Penambahan enzim di atas konsentrasi tersebut tidak merubah aktivitas enzim secara signifikan walaupun terjadi sedikit penurunan maupun peningkatan aktivitas pada konsentrasi enzim 9 mg/mL dan 10,8 mg/mL. Hal ini mengindikasikan bahwa pada konsentrasi enzim 7,2 mg/mL aktivitas mencapai maksimum. Pada konsentrasi enzim optimum ini, seluruh bagian *active site* dari enzim berikatan dengan substrat membentuk kompleks enzim substrat.

Konsentrasi enzim optimum yang diperoleh pada penelitian ini tidak jauh berbeda dengan konsentrasi enzim optimum pada penelitian sebelumnya, yakni 5,0076 mg/mL [24].

5. Kesimpulan

Keong sawah memiliki potensi menghasilkan enzim selulase, melalui isolasi hepatopankreas dengan teknik destruksi, homogenisasi dan sentrifugasi. Aktivitas enzim selulase yang diperoleh meningkat pada kondisi optimum yakni pada konsentrasi substrat serbuk gergaji 2% (b/v), pH 5,8, suhu 40 °C, dan konsentrasi enzim 7,2 mg/mL.

Ucapan Terima Kasih

Penulis menyampaikan terimakasih kepada Prof. Abd. Rauf Patong dan ibu Dr. Seniwati Dali, MSi yang telah memberikan pengarahan dan petunjuk dalam menyelesaikan jurnal ilmiah ini, serta kepada Dirjen DIKTI atas bantuan beasiswa selama penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Jyotsna KP, Vijayalakshmi K, Prasanna ND, Shaheen SK. Isolation, Characterization of Cellulase Producing *Lysinibacillus sphaericus* MTCC No. 9468 from Gut of *Eisenia foetida*. *The Bioscan*, 2010, **6**; 325-327.
- Barman D, Saud ZA, Habib MR, Islam MF, Hossain K, Yeasmin T. Isolation of Cellulolytic Bacterial Strain from Effective and Efficient Bioconversion of Solid State. *Life Sci. and Med. Res.*, 2011, **25**.
- Rehman FU. Isolation of Cellulolytic Activities from *Tribolium castaneum* (Red Flour Beetle). *African J. of Biotech.*, 2009, **8**; 6710 - 6715.
- Peciulyte D. Isolation of Cellulolytic Fungi from Waste Paper Gradual Recycling Materials. *Ekologia*, 2007, **53**; 11-18.
- Ain QU, Baig S, Saleem M. Production and Characterization of Cellulases Of *Aspergillus niger* by Using Rice Husk and Saw Dust as Substrates. *Pak. J. Bot.*, 2012, **44**; 377-382.
- Iranmahboob J, Nadim JF, Monemi S. Optimizing Acid-hydrolysis: a Critical Step for Production of Ethanol from Mixed Wood Chips. *Biomass and Bioenergy*, 2002, **22(5)**; 401-404
- Ojumu TV, Solomon BO, Betiku E, Layokun SK, Amigun B. Cellulase Production by *Aspergillus Flavus* Linn Isolate NSPR 101 Fermented in Sawdust, Bagasse and Corn cob. *African J. of Biotech.*, 2003, **2(6)**; 150-152.
- Giorgio EM, Fonseca MI, Tejerina MR, Ramos-Hryb AB, Sanabria N, Zapata PD, Villalba LD. Chips and Sawdust Substrates Application for Lignocellulolytic Enzymes Production by Solid State Fermentation. *Int. Res. J. of Biotech.*, 2012, **3(7)**; 120-127.
- Chinedu NS, Nwinyi OC, Okochi VI. Growth and Cellulase Activity of Wild-Type *Aspergillus Niger* ANL301 in Different Carbon Sources. *Canadian J. Pure and Appl. Sci.*, 2008, **2(2)**; 357-362.
- Farris JL, Grudzein SE, Belanger DS, Cherry J, Cairns Jr. J. Molluscan Cellulolytic Activity Responses to Zinc Exposure in Laboratory and Field Stream Comparisons. *Hydrobiologia*, 1994, **287**; 161-178.
- Siregar SH. Isolasi Enzim Selulase dari Pankreas Keong Mas. *Jurnal Photon*, 2009, **1(2)**.
- Maisaroh. Hidrolisis Selulosa Bagas dengan Enzim Selulase dari Bekicot *Achatina fulica* untuk Produksi Etanol dengan *Zymonas mobilis* A3. Tesis. Surabaya: Institut Teknologi Sepuluh November, 2009.
- Masfufatun. Hidrolisis Selulosa Carboxy Methyl Cellulose dengan Enzim Selulase dari Bekicot *Achatina fulica* untuk Produksi Etanol dengan *Zymonas mobilis* Tesis. Surabaya: Institut Teknologi Sepuluh November, 2010.
- Li Y., Min Q., Ding M. & Zhao, F. (2009). Purification, Characterization and Molecular Cloning of a Novel Endo-β-1,4-glucanase AC-EG65 from the Mollusc *Ampullariacrossean*. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 2009 **153(2)**; 149-56. doi: 10.1016/j.cbpb.2009.02.011.
- Fagbohunka BS, Agboola FK, Afolayan A. Characterization of Cellulase from the haemolymph of the giant African snail (*Archactina marginata*). *African J. of Biotech.*, 2012, **11(38)**; 9254-64, 10 May, 2012 DOI: 10.5897/AJB10.2071
- Koswara W. Penyebaran dan Kelimpahan Beberapa Jenis Keong Gondang (*Pila* spp.) di Perairan Rawa Pening, Jawa Tengah. *Karya Ilmiah*. Bogor: Fakultas Perikanan Institut Pertanian Bogor, 1985.
- Watanabe H, Tokuda G. Review: Animal cellulases, CMLS Cell. *Mol Life Sci*, 2001, **58**; 1167-78.
- Gunam IBW, Wartini WM, Anggraeni AMD, Suparyana PM. Delignifikasi Ampas Tebu dengan Larutan Natrium Hidroksida Sebelum Proses Sakarifikasi secara Enzimatis Menggunakan Enzim Selulase Kasar dari *Aspergillus niger* FNU 6018. *Teknologi Indonesia LIPI*, 2011, **34**.
- Raghavendra B, Havannavar GSG. Pre-treatment of Agroresidues for Release of Maximum Reducing Sugar. *Karnataka J. Agric. Sci*, 2007, **20(4)**; 771-772.
- Datta R. Acidogenic Fermentation of Lignocellulose-acid yield and Conversion of Components. *Biotechnology and Bioengineering*, 1981, **23**; 2167-70.
- Irfan M. Effect of NaOH and H₂O₂ on Degradation of Saw Dust. *Wulfenia Journal*, 2013, **1**.
- Kim B, Gulati I, Park J, Shin JS. Pretreatment of Cellulosic Waste Sawdust into Reducing Sugars Using Mercerization and Etherification. *BioResources*, 2012, **7(4)**; 5152-66.
- Kobayashi H, Hatada Y, Tsubouchi T, Nagahama T, Takami H. The Hadal Amphipod *Hirondellea gigas* Possessing a Unique Cellulase for Digesting Wooden Debris Buried in the Deepest Seafloor. *PLoS One.*, 2012, **7(8)**. doi: 10.1371/journal.pone.0042727.
- Maryani D. Optimalisasi Konversi Selulosa Menjadi Glukosa pada Limbah serbuk Kayu Agatis Menggunakan Aktivator Ca²⁺ terhadap Enzim selulase pada Usus Sapi *Skripsi*. Makassar: Universitas Hasanuddin, 2006.