

# Penentuan Jenis Pelarut Ekstraksi Terbaik dan Pengaruh Waktu Fermentasi pada Aktivitas $\beta$ -galaktosidase dari *Lactobacillus lactis*

Geraldys Andreas Sitepu, Army Adi Sutanningsih, Nancy Siti Djengar

Jurusan Teknik Kimia, Politeknik Negeri Bandung, Bandung 40012  
E-mail : geraldys.andreas.anki17@polban.ac.id

## ABSTRAK

Enzim  $\beta$ -galaktosidase (laktase) digunakan dalam produksi susu rendah laktosa untuk konsumsi penderita intoleransi laktosa. Dalam proses metabolismenya, enzim ini dapat menghidrolisis laktosa menjadi glukosa dan galaktosa. *Lactobacillus lactis* merupakan salah satu bakteri asam laktat yang dapat menghasilkan  $\beta$ -galaktosidase secara intraseluler. Dalam penelitian ini  $\beta$ -galaktosidase dari *Lactobacillus lactis* diekstraksi melalui tiga jenis pelarut, yaitu isoamyl Alkohol, SDS-Kloroform, dan Toluena-Aseton. Substrat yang digunakan adalah oNPG (o-nitrophenol- $\beta$ -Dgalactopyranoside), dimana  $\beta$ -galaktosidase akan menghidrolisis substrat menjadi oNP dan  $\beta$ -D-galactose. Berdasarkan nilai oNP yang tertinggi sebesar 8,206  $\mu$ mol, pada pH 7 dengan waktu dan suhu inkubasi masing-masing 24 jam dan 37°C, maka pelarut Toluena-Aseton lebih baik dari kedua pelarut lainnya. Sedangkan nilai aktivitas  $\beta$ -galaktosidase tertinggi yaitu sebesar 13,02 U/mL dengan waktu inkubasi dan fermentasi masing-masing 15 menit dan 24 jam.

## Kata Kunci

$\beta$ -galaktosidase, ekstraksi, *Lactobacillus lactis*, fermentasi

## 1. PENDAHULUAN

Intoleransi laktosa adalah ketidakmampuan menyerap laktosa di dalam tubuh, yang diakibatkan karena kekurangan  $\beta$ -galaktosidase (laktase) di dalam usus halus yang ditandai dengan gejala klinis yaitu sakit pada bagian abdomen, buang angin yang berlebihan, ataupun diare yang terjadi pada 30 menit hingga 2 jam setelah mengkonsumsi laktosa. Para penderita intoleransi laktosa harus menghindari produk berbahan susu dikarenakan penderita dapat mengalami diare akut pada waktu yang relatif cepat. Fakta menunjukkan bahwa susu memiliki peran yang penting dalam memberikan nutrisi untuk tulang. Sehingga orang-orang yang tidak mengkonsumsi susu karena intoleransi laktosa akan memiliki resiko penyakit osteoporosis yang lebih besar dikarenakan kekurangan kalsium pada tulang [1].

Penyebab intoleransi laktosa adalah tidak memiliki enzim  $\beta$ -galaktosidase yang cukup dalam tubuh. Oleh karena itu, penderita intoleransi laktosa hanya dapat mengkonsumsi susu rendah laktosa yang harganya relatif mahal karena masih harus diimpor dari luar negeri [1].

$\beta$ -galaktosidase adalah enzim yang dapat memecah laktosa menjadi glukosa dan galaktosa. Oleh karena itu, enzim ini dapat menjadi solusi bagi penderita intoleransi laktosa.  $\beta$ -galaktosidase dapat diperoleh dari berbagai mikroorganisme, seperti bakteri dan jamur. Bakteri penghasil enzim ini diantaranya *Lactococcus lactis*, *Thermotoga maritima*,

*Lactobacillus bulgaricus*, *Bacillus sp.*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*, *Enterobacter cloacae* [2]. Sedangkan jamur penghasil enzim  $\beta$ -galaktosidase diantaranya *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus aculeatus*, *Penicillium expansum*, *Penicillium chrysogenum*, *Paecilomyces aeruginosus*, *Aspergillus niger* [2]. *Lactobacillus lactis* (*L. lactis*) merupakan salah satu bakteri asam laktat yang dapat menghasilkan  $\beta$ -galaktosidase. *L. lactis* sudah dipakai di berbagai industri makanan, seperti produksi produk-produk yang mengandung susu (*dairy*). *L. lactis* dapat menghasilkan  $\beta$ -galaktosidase secara intraseluler.  $\beta$ -galaktosidase intraseluler merupakan enzim yang terbentuk di dalam sel dan tidak diekskresikan ke dalam medium fermentasi. Sehingga untuk memperolehnya, diperlukan ekstraksi dengan cara memecahkan dinding sel *L. lactis* [2].

Terdapat tiga jenis metode ekstraksi  $\beta$ -galaktosidase intraseluler, yaitu metode fisika, kimia, dan enzimatik. Ketiga jenis metode tersebut berfungsi untuk memecahkan sel mikroba sehingga enzim dapat keluar dari dalam sel. Secara umum, metode fisika yang digunakan adalah *ultrasonication*, *homogenizer*, dan *bead mills*. Sedangkan metode kimia secara umum menggunakan berbagai pelarut organik, seperti toluena, kloroform, dan etanol. Metode enzimatik memanfaatkan enzim yang dapat merusak dinding sel bakteri, seperti enzim Lisozim [2].

Untuk melihat keberhasilan  $\beta$ -galaktosidase dalam menghidrolisis laktosa menjadi glukosa dan

galaktosa, maka harus ditentukan besaran aktivitas dari enzim tersebut dengan menggunakan substrat antara lain oNPG (o-nitrophenol- $\beta$ -Dgalactopyranoside). Substrat oNPG akan dihidrolisis oleh  $\beta$ -galaktosidase menjadi o-nitrophenol (oNP) dan  $\beta$ -D-galactose. Senyawa oNP ini dapat menyerap cahaya pada  $\lambda_{\max}$  420 nm, sedangkan senyawa oNPG tidak. Oleh karena itu, absorbansi tertinggi pada  $\lambda_{\max}$  420 nm dapat digunakan untuk menentukan aktivitas  $\beta$ -galaktosidase [3].

Tujuan dari penelitian ini yaitu mengetahui jenis pelarut terbaik untuk mengekstraksi  $\beta$ -galaktosidase dari bakteri asam laktat (BAL) *L. lactis* juga pengaruh waktu fermentasi terhadap aktivitas enzim tersebut. Dalam penelitian ini jenis pelarut yang dipilih adalah isoamyl Alkohol, SDS-Kloroform, dan Toluena-Aseton.

## 2. METODOLOGI PENELITIAN

### 2.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bioproses, Jurusan Teknik Kimia, Politeknik Negeri Bandung yang beralamat di Jl.Gegerkalong Hilir, Ciwaruga, Kec. Parongpong, Kabupaten Bandung Barat, Jawa Barat.

### 2.2 Alat dan Bahan

**Alat** yang digunakan yaitu autoklaf, inkubator, *centrifuge*, spektrofotometer visible, *laminar air flow*, neraca analitik, termometer, cawan petri, tabung reaksi, pembakar spiritus, erlenmeyer, pipet, spatula, gelas ukur, jarum ose, kuvet kuarsa.

**Bahan** dan zat kimia yang digunakan yaitu bakteri *Lactobacillus lactis*, oNPG (*o-nitrophenol- $\beta$ -Dgalactopyranoside*), aseton, toluen, kloroform, isoamil Alkohol, *Nutrient Broth*, *Pantothenate Culture Agar* NaCl 0,9 %, *Buffer* fosfat, laktosa.

### 2.3 Prosedur Kerja

**Regenerasi** *L. lactis* dilakukan dalam media *Pantothenate Culture Agar* yang terbuat dari 2 gram *yeast extract*, 0,5 gram *dextrose*, 0,5 gram Na-asetat, 1,5 gram agar yang dilarutkan dalam 100 mL *Aqua DM*. Kemudian pH media tersebut diatur hingga  $\pm 6,8$ . Media tersebut disterilkan menggunakan

autoklaf 121°C selama 15 menit lalu dibuat media agar miring dalam tabung reaksi.

**Inokulasi** *L. lactis* dalam media *Nutrient Broth* + 1% yang sudah disterilisasi, kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam.

**Produksi  $\beta$ -galaktosidase** dengan cara 10 mL inokulum *L.lactis* dipindahkan kedalam 40 mL media *Nutrient Broth* + 2%, kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Supernatan dengan pellet dipisahkan menggunakan sentrifugasi dengan kecepatan 4500 rpm, suhu 4°C selama 60 menit.

### Ekstraksi $\beta$ -galaktosidase intraseluler:

#### a) Pelarut Isoamyl Alkohol

Pellet yang diperoleh ditambahkan 5 mL *buffer* Fosfat 0,1 M (pH 7) kemudian ditambahkan 200  $\mu$ L isoamyl Alkohol. Inkubasi selama 12 jam (37°C), supernatant (enzim kasar) diperoleh menggunakan sentrifugasi dengan kecepatan 4500 rpm, suhu 4°C selama 30 menit.

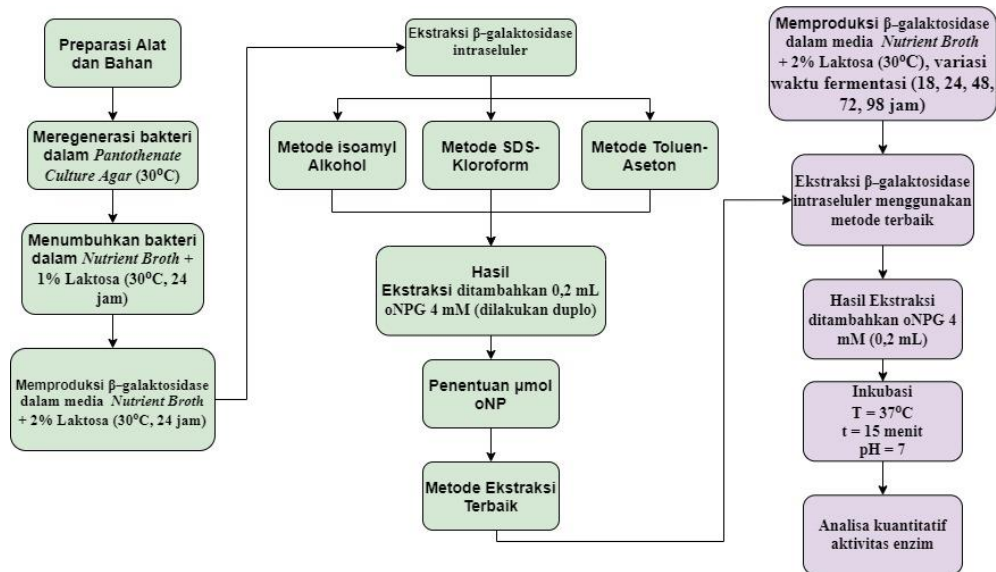
#### b) Pelarut SDS-Kloroform

Pellet yang diperoleh ditambahkan 5 mL *buffer* Fosfat 0,1 M (pH 7) kemudian ditambahkan 200  $\mu$ L 1% SDS dan Kloroform (2:5). Larutan diinkubasi selama 12 jam (37°C), supernatant (enzim kasar) diperoleh menggunakan sentrifugasi dengan kecepatan 4500 rpm, suhu 4°C selama 30 menit.

#### c) Pelarut Toluena-Aseton

Pellet yang diperoleh ditambahkan 5 mL *buffer* Fosfat 0,1 M (pH 7) kemudian ditambahkan 200  $\mu$ L Toluena dan Aseton (9:1). Larutan diinkubasi selama 12 jam (37°C), supernatant (enzim kasar) diperoleh menggunakan sentrifugasi dengan kecepatan 4500 rpm, suhu 4°C selama 30 menit.

**Uji aktivitas  $\beta$ -galaktosidase** dilakukan dengan cara 20  $\mu$ L enzim kasar ditambahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 1 mL *buffer* fosfat 0,1 M (pH 7). Larutan diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit menggunakan *waterbath*. Selanjutnya ditambahkan 200  $\mu$ L larutan oNPG 4mM. Larutan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 15 menit menggunakan *waterbath*. Ditambahkan 1 mL larutan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M ke dalam tabung reaksi (pH 10-11) untuk menghentikan aktivitas enzim. Absorbansi larutan diukur menggunakan spektrofotometer *vis* pada  $\lambda_{\max}$  420 nm.



Gambar 1. Diagram Alir Penelitian

### 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 3.1 Penentuan Jenis Pelarut Ekstraksi Terbaik

Dalam penelitian ini dilakukan penentuan metode ekstraksi secara kimia menggunakan berbagai pelarut dengan sifat kepolaran yang berbeda-beda. Untuk menentukan jenis pelarut yang memiliki kemampuan berinteraksi dengan membran sel tanpa mendenaturasi  $\beta$ -galaktosidase, maka dilakukan penentuan aktivitas pembentukan oNP. Hasil perhitungan pembentukan oNP pada setiap jenis pelarut ditunjukkan dalam Tabel 1 berikut ini:

Tabel 1. Data Penentuan Jenis Pelarut Ekstraksi Terbaik

Jenis Pelarut	$\mu\text{mol oNP}$
Toluene-Aseton	8,206
isoamyl Alkohol	5,724
SDS-Kloroform	2,754

Dari tabel 1 menunjukkan bahwa nilai tertinggi pembentukan oNP diperoleh menggunakan pelarut Toluene-Aseton yaitu sebesar 8,206  $\mu\text{mol}$ . Hal ini membuktikan bahwa pelarut Toluene-Aseton lebih baik dari kedua pelarut lainnya.

*L. lactis* merupakan bakteri gram positif yang menghasilkan  $\beta$ -galaktosidase secara intraseluler [4]. Salmi [5] menyebutkan bahwa bakteri gram positif memiliki struktur dinding sel yang terdiri dari peptidoglikan, lipid, dan polisakarida (asam teikoat). Asam teikoat merupakan polimer yang larut dalam air, yang berfungsi sebagai tempat keluar atau masuknya ion positif antara membran dengan lingkungan. Berdasarkan sifat larut dalam air tersebut yang menunjukkan bahwa dinding sel

bakteri gram positif memiliki sifat polar. Lipid pada membran sel mempunyai dua sisi bersifat polar dan nonpolar yang berfungsi untuk melindungi bagian dalam sel. Oleh sebab itu, dibutuhkan kombinasi pelarut yang tepat untuk melarutkan dinding sel.

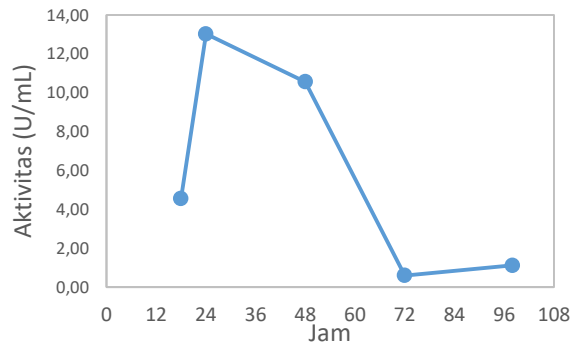
Karakteristik pelarut pada jenis pelarut isoamyl alkohol dan SDS-Kloroform bersifat semipolar. Dari nilai  $\mu\text{mol oNP}$  yang dihasilkan, menunjukkan bahwa sifat semipolar kurang baik untuk memecahkan sel. Selain itu, sifat pelarut semipolar cenderung menyebabkan denaturasi enzim [6].

Pada pelarut Toluene-Aseton, dinding sel *L. Lactis* yang bersifat polar dapat larut oleh Aseton. Sedangkan sifat nonpolar dari lipid dapat larut oleh adanya toluen. Selain itu, dilihat dari nilai pembentukan oNP, pelarut Toluene-Aseton cenderung tidak mendenaturasi  $\beta$ -galaktosidase. Oleh karena itu, pelarut Toluene-Aseton digunakan untuk mengekstraksi  $\beta$ -galaktosidase pada penentuan pengaruh waktu fermentasi pada aktivitas  $\beta$ -galaktosidase.

#### 3.2 Pengaruh Waktu Fermentasi pada Aktivitas $\beta$ -galaktosidase

Pada tahap ini dipelajari mengenai pengaruh waktu fermentasi *L. lactis* pada aktivitas  $\beta$ -galaktosidase. Pada penelitian ini waktu fermentasi bakteri telah dilakukan pada rentang 18-96 jam pada suhu 30°C, pH 7. Setelah mencapai waktu yang ditentukan, fermentasi dihentikan dan dilakukan ekstraksi  $\beta$ -galaktosidase menggunakan jenis pelarut terbaik yaitu Toluene-Aseton. Enzim kasar kemudian diukur aktivitas dan menghasilkan aktivitas  $\beta$ -galaktosidase yang berbeda-beda, hasilnya dapat dilihat pada tabel 2.

Hubungan antara aktivitas  $\beta$ -galaktosidase terhadap waktu fermentasi ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Aktivitas β-galaktosidase Terhadap Waktu Fermentasi *Lactobacillus lactis*

Berdasarkan Gambar 2, aktivitas β-galaktosidase meningkat secara bertahap berdasarkan waktu fermentasi dan selanjutnya terjadi fluktuasi. Peningkatan aktivitas meningkat secara signifikan yaitu sebesar 13,02 U/mL yang terjadi setelah mencapai waktu fermentasi 24 jam. Namun berikutnya, peningkatan waktu fermentasi menghasilkan penurunan aktivitas β-galaktosidase. Hal ini dapat disebabkan karena fermentasi dilakukan secara batch, sehingga sel *L. lactis* mengalami fase stasioner dan mengalami penuaan, nutrisi berkurang secara signifikan, dan akhirnya mengalami fase kematian. Pada kondisi tersebut akan terjadi penurunan aktivitas β-galaktosidase [7].

Nilai aktivitas β-galaktosidase dari *L. lactis* pada waktu fermentasi 24 jam sebesar 13,02 U/mL, memiliki nilai aktivitas yang hampir sama dengan aktivitas β-galaktosidase dari *Lactococcus lactis* yaitu sebesar 13,825 U/mL pada waktu fermentasi dan suhu yang sama yang dilakukan oleh Pusat Penelitian Bioteknologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia Cibinong [8]. Terdapat perbedaan antara *Lactobacillus lactis* dengan *Lactococcus lactis*, dimana *Lactobacillus lactis* termasuk ke dalam family *Lactobacillaceae*, dan *Lactococcus lactis*

termasuk ke dalam family *Streptococcaceae*. *Lactobacillaceae* adalah bakteri yang memiliki sel berbentuk batang atau basil. *Streptococcaceae* adalah bakteri yang berbentuk bulat atau kokus. Namun kedua family tersebut termasuk ke dalam bakteri asam laktat (BAL) atau order *Lactobacillales*. Dilihat dari aktivitas β-galaktosidase yang dihasilkan dari kedua bakteri tersebut, menunjukkan bahwa walaupun family dan bentuk sel berbeda, namun karakteristik enzim yang dihasilkan mempunyai kemiripan.

#### 4. KESIMPULAN

Berdasarkan nilai oNP yang tertinggi sebesar 8,206 μmol, pada pH 7 dengan waktu dan suhu inkubasi masing-masing 24 jam dan 37°C, maka pelarut Toluena-Aseton lebih baik dari pelarut isoamyl alkohol dan SDS-kloroform. Nilai aktivitas β-galaktosidase tertinggi yaitu sebesar 13,02 U/mL dengan waktu inkubasi dan fermentasi masing-masing 15 menit dan 24 jam. Perbandingan aktivitas β-galaktosidase antara *Lactobacillus lactis* dengan *Lactococcus lactis* menunjukkan bahwa walaupun family dan bentuk sel berbeda, namun nilai aktivitas enzim yang dihasilkan mempunyai kesamaan.

Untuk penelitian selanjutnya dapat dilakukan penentuan aktivitas enzim menggunakan metode ekstraksi secara fisika (sonikator) sehingga dapat membandingkan perbedaan aktivitas enzimnya yang telah diperoleh secara kimia. Untuk mendapatkan fraksi enzim yang lebih murni dan aktivitas β-galaktosidase yang lebih tinggi, maka β-galaktosidase hasil ekstraksi disarankan dimurnikan terlebih dahulu antara lain dengan cara dialisis. Agar β-galaktosidase dapat digunakan berulang-ulang, maka selanjutnya dapat dilakukan imobilisasi dengan metode tertentu.

Tabel 2. Aktivitas β-galaktosidase dari setiap Waktu Fermentasi

Waktu fermentasi (Jam)	Absorbansi	Volume Enzim (mL)	Volume oNPG 4 mM (mL)	Waktu Inkubasi (menit)	pH Inkubasi (°C)	Suhu Inkubasi (°C)	μmol oNP	Aktivitas (U/mL)
18	0,150	0,02	0,2	15	7	37	1,370	4,566
24	0,425	0,02	0,2	15	7	37	3,907	13,023
48	0,345	0,02	0,2	15	7	37	3,169	10,563
72	0,021	0,02	0,2	15	7	37	0,180	0,600
98	0,038	0,02	0,2	15	7	37	0,337	1,122

Catatan: Absorbansi diukur pada λ<sub>max</sub> 420nm

**DAFTAR PUSTAKA**

- [1] Devaraja Gayathri and Vasudha M. Lactose Intolerance with Special Emphasis on Probiotics for Management, 2018, EC Nutrition 13.5: 325-332.
- [2] Anisha, G.S., 2017. Current Developments In Biotechnology And Bioengineering. Government College For Women, Trivandrum, Kerala. India.
- [3] Held, P., 2007. Kinetic Analysis of  $\beta$ -Galactosidase Activity using the PowerWave<sup>TM</sup> HT and Gen5<sup>TM</sup> Data Analysis Software Basic enzyme kinetic determinations.
- [4] Song, 2017. A review on Lactococcus lactic: from food to factory. Microb Cell Fact, p. 16:55.
- [5] Salni, H.M., dan Ratna, W.M., 2011. Isolasi Senyawa Antibakteri Dari Daun Jengkol (*Pithecolobium lobatum* Benth) dan Penentuan Nilai KHM-nya. Jurnal Penelitian Sains. 14 (1 D) 14109.
- [6] Numanoglu, Y. and Sungur, S., 2004.  $\beta$ -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis* cell disruption and enzyme immobilization using a cellulose-gelatin carrier system. Process Biochemistry, 39(6), pp.705-711.
- [7] Kumar DJ, Jayanthisiddhuraj M, Monica DD, Naganarayani K, Immaculate A, Rebecca N, Kalaichelvan PT, 2012. Concomitant production of  $\alpha$ -amylase and  $\beta$ -galactosidase by native *Bacillus* sp. MNJ23 isolated from dairy effluent. Am Eurasian J Agric Environ, p. 579-587.
- [8] Pusat Penelitian Bioteknologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia Cibinong, 2018.