

Isolasi Enzim Laktase untuk Mengurangi Kadar Laktosa Susu bagi Penderita Intoleransi Laktosa

Geraldys Andreas Sitepu, Elsa Rizki Ramadhani Putri, Inayah

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

ABSTRAK

Enzim laktase (β -galactosidase) adalah enzim yang digunakan dalam produksi susu rendah/bebas laktosa yang dikonsumsi terutama manusia yang memiliki intoleransi laktosa. Dalam penelitian yang sudah banyak dilakukan, enzim laktase diisolasi dari berbagai spesies bakteri asam laktat (BAL). *Lactobacillus lactis* adalah salah satu spesies bakteri asam laktat yang menjadi perhatian dalam penelitian ini. Isolat enzim laktase diperoleh dengan metode kimia menggunakan pelarut toluene dan metode fisika menggunakan sonikasi untuk memecahkan sel. Hasil penelitian secara kualitatif menggunakan metode fehling dan oNPG disc menunjukkan secara positif *Lactobacillus lactis* menghasilkan enzim laktase. Pada pengujian semi kuantitatif dilakukan menggunakan strip Bayer Keto-Diastix menunjukkan bahwa kadar glukosa hasil hidrolisis berada pada rentang 0-990 ppm. Penelitian ini berkelanjutan untuk mengetahui aktivitas isolat enzim dari *Lactobacillus lactis*, kemudian dapat menjadi referensi bagi penelitian-penelitian selanjutnya dan sebagai penghasil enzim laktase untuk mengurangi kadar laktosa dalam susu.

Kata Kunci

Laktase, intoleransi laktosa, *Lactobacillus lactis*

1. PENDAHULUAN

Intoleransi laktosa sering diderita anak-anak. Sekitar 70% anak dan remaja di seluruh dunia mengalami intoleransi laktosa [1]. Di Indonesia, khususnya di Jakarta, 21% anak usia 3-5 tahun mengalami intoleransi laktosa, 58% pada anak 6-11 tahun [2]. Intoleransi laktosa adalah suatu kondisi di mana orang mengalami gejala pencernaan, seperti kembung, diare, dan pengeluaran gas setelah makan atau minum susu atau produk susu lainnya [3].

Penyebab intoleransi laktosa adalah tidak memiliki enzim laktase dalam tubuh yang cukup. Konsumsi laktosa bagi konsumen intoleransi laktosa dapat dilakukan dengan memecah terlebih dahulu laktosa yang ada dalam produk seperti susu dengan menggunakan enzim laktase. Oleh karena itu, penderita intoleransi laktosa hanya dapat mengonsumsi susu rendah laktosa. Namun, susu rendah laktosa yang ada di pasaran banyak diimpor dari luar negeri dan harganya mahal [4].

β -galactosidase (laktase) telah menarik perhatian banyak peneliti karena memiliki banyak potensi di berbagai bidang industri, tidak lain di Indonesia. Banyak penelitian yang dilakukan untuk mendapatkan isolat enzim laktase dari berbagai mikroba yang paling optimum. Enzim ini dapat diproduksi dari berbagai macam sumber seperti bakteri, ragi dan jamur. Berbagai jenis dan spesies bakteri dilaporkan mengandung β -galactosidase [5], [6], [7]. Perbedaan karakter β -galactosidase mungkin dihasilkan dari perbedaan jenis dan spesies

bakteri yang memproduksi β -galactosidase. Selain itu, diperkirakan bahwa kondisi optimum yang berbeda dari β -galactosidase (aktivitas enzim, suhu dan pH) mungkin dihasilkan dari perbedaan karakter laktase dari bakteri yang berbeda. Telah dilaporkan bahwa ada kondisi optimum yang berbeda dari aktivitas β -galactosidase antara berbagai jenis mikroorganisme [6]. Terlepas dari kenyataan bahwa banyak teknik telah dikembangkan berdasarkan berbagai mikroorganisme, masih ada kebutuhan untuk sumber enzim alternatif. Misalnya, dalam industri susu, laktase yang stabil dalam pH yang lebar dan kisaran suhu yang harus digunakan.

Lactobacillus lactis (*L. lactis*) merupakan salah satu bakteri asam laktat. *L. lactis* sudah dipakai di berbagai industri makanan, seperti produksi produk-produk yang mengandung susu (*dairy*). Sehingga *L. lactis* dapat menjadi bakteri alternatif penghasil β -galactosidase yang diperlukan untuk mengurangi kadar laktosa dalam susu.

Enzim laktase yang dihasilkan dari bakteri secara umum bersifat intraseluler dan dapat diisolasi dengan berbagai metode. Terdapat tiga jenis metode isolasi β -galactosidase secara 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 toluen, kloroform, dan etanol. Metode enzimatik

memanfaatkan enzim yang dapat merusak dinding sel bakteri, seperti enzim Lisozim [8].

Untuk melihat kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim laktase yang dapat mengurangi kadar laktosa dengan cara menghidrolisis laktosa menjadi glukosa dan galaktosa, maka harus ditentukan keberadaan aktivitas dari enzim tersebut dengan menggunakan substrat antara lain oNPG (o-nitrophenol- β -Dgalactopyranoside). Secara positif, keberadaan enzim laktase dapat diketahui ketika warna larutan yang sudah ditambahkan isolat berwarna kuning [9]. Selain substrat oNPG, dapat digunakan substrat laktosa. Pengujian keberadaan enzim laktase menggunakan substrat laktosa dapat dilakukan menggunakan metode fehling dengan melihat kepekatan larutan yang sudah ditambahkan isolat enzim [10].

Pada penelitian ini, dilakukan isolasi enzim laktase dengan metode sonikasi (fisika) dan metode toluen (kimia). Hasil isolasi enzim diuji secara kualitatif dan semi kuantitatif untuk mengetahui kemampuan *L. lactis* dalam menghasilkan enzim laktase.

2. METODE PENELITIAN

2.1 Alat dan Bahan

2.1.1 Alat

Autoklaf, inkubator, *centrifuge*, sonikator, *laminar air flow*, neraca analitik, termometer, cawan petri, tabung reaksi, pembakar spirtus, erlenmeyer, pipet, spatula, gelas ukur, jarum ose, kuvet kuarsa.

2.1.2 Bahan

Padatan MRS Broth, Bayer Keto-Diastix, Beef Extract, Pereaksi Molisch, Yeast Extract, Laktosa, Pepton, Glukosa, *Lactobacilluslactis*, toluen, *Nutrient Broth*, *Pantothenate Culture Agar* NaCl 0,9 %, *Buffer* fosfat, laktosa, oNPG(o-nitrophenol- β -Dgalactopyranoside) Disc.

2.2 Tahapan Prosedur Penelitian

2.2.1 Membuat Media Pertumbuhan Bakteri *Lactobacillus lactis*

Media pertumbuhan Bakteri *Lactobacillus lactis* adalah *Pantothenate Culture Agar* yang terbuat dari 2 gram yeast extract, 0,5 gram dekstrosa, 0,5 gram Na-Asetat, 1,5 gram agar yang dilarutkan dalam 100 mL amidis. 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.

2.2.2 Memperbanyak Kultur Bakteri *Lactobacillus lactis*

Bakteri *Lactobacillus lactis* digesek ke dalam media agar miring yang sebelumnya telah dibuat.

Kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 30°C selama 3 hari.

2.2.3 Isolasi Enzim Laktase

a) Metode Sonikasi

Bakteri *Lactobacillus lactis* hasil inokulasi di inkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Hasil inokulasi pertama kemudian di inokulasikan kembali kedalam media cair MRS dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Inokulum aktif dimasukkan ke media produksi (media cair MRS yang ditambahkan substrat laktosa 1%) dan diinkubasi pada suhu 30°C, pH 5,6 selama 24 jam. Kemudian hasilnya disentrifugasi pada kecepatan 4500 RPM, suhu 4°C selama 60 menit. Biomassa yang diperoleh kemudian ditambahkan dengan buffer fosfat 0,1 M pH 7. Selanjutnya dilakukan sonikasi 30 Hz selama 30 menit. Setelah disonikasi, dilakukan sentrifuge kembali suspense sel dengan kecepatan 4500 RPM, suhu 4°C selama 60 menit.

b) Metode Toluena

Bakteri *Lactobacillus lactis* hasil inokulasi di inkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Hasil inokulasi pertama kemudian di inokulasikan kembali kedalam media cair *Nutrient Broth* dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Inokulum aktif dimasukkan ke media produksi (media cair *Nutrient Broth* yang ditambahkan substrat laktosa 2%) dan diinkubasi pada suhu 30°C, pH 7 selama 24 jam. Kemudian hasilnya disentrifugasi pada kecepatan 4500 RPM, suhu 4°C selama 60 menit. Biomassa yang diperoleh kemudian ditambahkan dengan buffer fosfat 0,1 M pH 7. Selanjutnya dilakukan penambahan toluena kemudian dilakukan *vortex* selama 1 menit.

2.2.4 Uji Kualitatif

Enzim Laktase hasil isolasi diatas kemudian dilakukan pengujian keberadaannya dengan menggunakan metode analisis kualitatif,

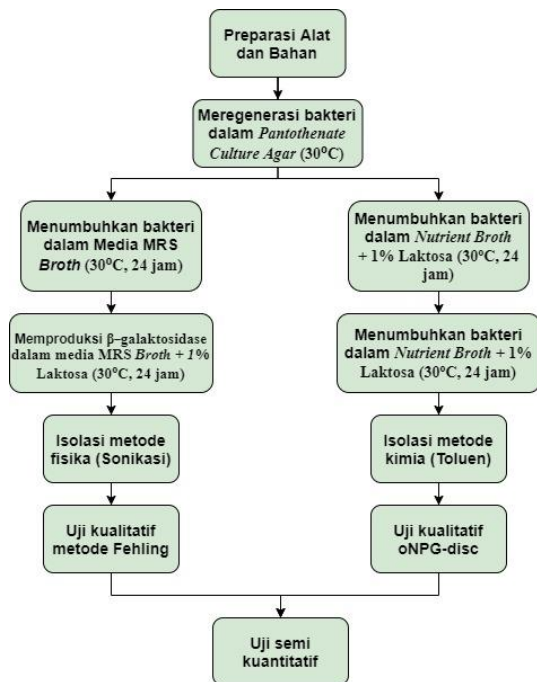
a) Metode Fehling

Penentuan kadar glukosa dilakukan untuk mengukur kemampuan enzim menghidrolisa laktosa menjadi glukosa dan galaktosa. Metode fehling digunakan untuk mengetahui keberadaan glukosa hasil hidrolisis oleh enzim. Sebanyak 1mL hasil isolasi enzim ditambahkan pada 1 mL larutan laktosa 1 M, kemudian ditambahkan beberapa tetes larutan fehling. Dilakukan pengamatan pada saat sebelum dan sesudah ditambahkan larutan fehling.

b) Metode oNPG-disc

Metode oNPG-disc digunakan untuk mengetahui keberadaan enzim laktase untuk menghidrolisa oNPG. Sebanyak 1mL hasil isolasi enzim ditambahkan kedalam tabung reaksi, kemudian dimasukkan oNPG-disc kedalam tabung reaksi.

Dilakukan pengamatan pada saat sebelum dan sesudah dimasukkan oNPG-disc.



Gambar 1. Diagram Alir Penelitian

2.2.5 Uji Semi Kuantitatif

Pada uji semi kuantitatif, 200 µL isolat enzim dipipet ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 mL buffer fosfat dan 1 mL larutan laktosa dengan konsentrasi 6000 ppm. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit. Larutan diteteskan ke strip reagen dan tunggu selama 30 detik dan lihat perubahan warnanya.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Perkembangbiakan bakteri *Lactobacillus lactis* sudah dapat dilakukan dengan baik. Setelah memvariasikan media yang digunakan, didapat media pertumbuhan bakteri yang terbaik yaitu menggunakan media selektif Pantothenate Culture Agar. Proses isolasi enzim laktase dilakukan sesuai prosedur.

Berikut tabel hasil uji kualitatif:

Tabel 1. Hasil isolasi enzim laktase dari *Lactobacillus lactis*

Metode Isolasi	Metode uji kualitatif	Hasil
Sonikasi	Fehling	+
Toluen	oNPG-disc	+

3.1 Uji Kualitatif Metode Fehling

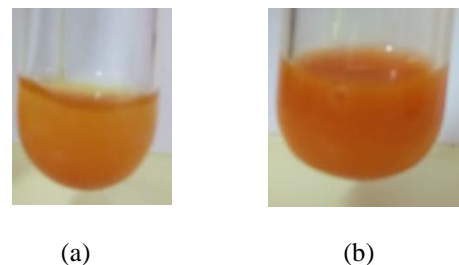
Pada uji kualitatif dilakukan dengan uji Fehling untuk melihat ada atau tidaknya aktivitas enzim. Larutan Fehling (CuO) digunakan untuk mengidentifikasi adanya gugus aldehid pada suatu senyawa, jika suatu pengujian dikatakan positif, maka akan terbentuk endapan merah Cu₂O [11].



Gambar 2. Reaksi gugus aldehid dengan larutan fehling.

Gugus aldehid terdapat pada struktur glukosa dan galaktosa. Glukosa dan galaktosa tersebut yaitu hasil dari hidrolisis laktosa dengan enzim laktase.

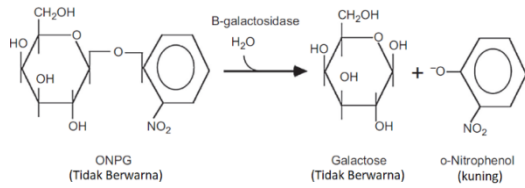
Dari hasil percobaan yang dapat dilihat pada gambar 1, sebelum dan sesudah ditambahkan isolat enzim laktase menunjukkan hasil yang positif. Pengujian sampel sebelum ditambahkan isolat enzim menunjukkan hasil yang positif dikarenakan laktase dapat terdegradasi sehingga memungkinkan terbentuknya glukosa. Namun didapat perbedaan warna yang dihasilkan, dimana sesudah ditambahkan isolat enzim, warna larutan lebih pekat dari sebelum ditambahkan. Dapat disimpulkan bahwa dari pengujian ini, adanya aktivitas enzim yang dapat diketahui, dimana kadar glukosa dan galaktosa bertambah setelah ditambahkan isolat enzim.



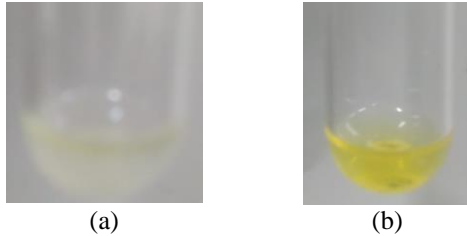
Gambar 3. a) sebelum ditambahkan isolat enzim laktase, b) setelah ditambahkan isolat enzim laktase

3.2 Uji Kualitatif Metode oNPG-disc

Pada uji kualitatif menggunakan substrat oNPG, menunjukkan hasil yang positif. Larutan isolat enzim sebelum ditambahkan oNPG-disc menunjukkan hasil yang tidak berwarna. Setelah larutan isolat enzim ditambahkan oNPG-disc, menunjukkan hasil berwarna kuning. Hal ini menunjukkan bahwa terjadi hidrolisis oleh enzim laktase menjadi o-nitrophenol (oNP) dan β-D-galactose. Senyawa oNP ini berwarna kuning, sedangkan senyawa oNPG tidak berwarna [9].



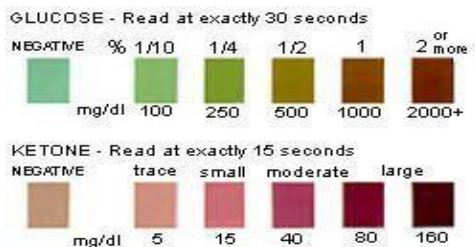
Gambar 4. Reaksi oNPG dengan enzim laktase.



Gambar 5. a) sebelum ditambahkan oNPG-disc, b) setelah ditambahkan oNPG-disc.

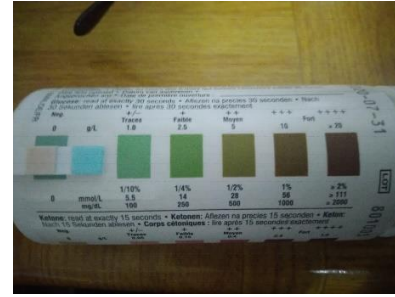
3.3 Uji Semi Kuantitatif

Pengujian aktivitas enzim secara semi kuantitatif dilakukan menggunakan produk Bayer Keto-Diastix. Bayer Keto-Diastix adalah strip reagen yang digunakan untuk mengetahui kadar glukosa dan keton dalam tubuh secara urinalisis. Bayer Keto-Diastix menawarkan metode pengujian urin yang sederhana, cepat dan nyaman untuk glukosa. Saat strip berubah warna, kadar glukosa dalam sampel dapat dibandingkan dengan bagan yang ada di kotak untuk melihat kadar yang terkandung didalam sampel [12].



Gambar 6. Rentang warna kadar glukosa dan keton dalam Bayer Keto-Diastix

Pada penelitian ini produk Bayer Keto-Diastix digunakan untuk mengukur kadar glukosa dari proses hidrolisis laktosa oleh enzim laktase. Pengukuran kadar glukosa dengan Bayer Keto-Diastix ini diharapkan dapat memberikan hasil aktivitas enzim laktase secara semi kuantitatif yang dilihat dari perubahan warna strip dan dibandingkan dengan bagan yang ada untuk menunjukkan kadar glukosa dari hasil hidrolisis laktosa dengan enzim laktase.



Gambar 7. Warna yang dihasilkan dari strip setelah ditetesi sampel

Dilihat dari perubahan warna strip, menunjukkan bahwa konsentrasi glukosa hasil hidrolisis berada diantara 0-100 mg/dl atau 0-990 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas enzim masih sangat rendah untuk dideteksi menggunakan Bayer Keto-Diastix. Aktivitas enzim yang rendah ini dapat disebabkan dari kerusakan enzim dan konsentrasi enzim yang rendah.

4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

1. Isolat enzim dari bakteri *Lactobacillus lactis* diperoleh menggunakan metode sonikasi (fisika) dan metode toluen (kimia) untuk memecah sel karena *Lactobacillus lactis* menghasilkan enzim laktase secara intraseluler. dengan
2. Pengujian aktivitas enzim ditentukan dengan cara kualitatif dan semi kuantitatif. Pada pengujian kualitatif dilakukan dengan metode Fehling dan oNPG-disc yang menunjukkan hasil positif. Pada pengujian semi kuantitatif dilakukan menggunakan strip Bayer Keto-Diastix menunjukkan bahwa kadar glukosa hasil hidrolisis berada pada rentang 0-990 ppm.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Bhatia JJS, Zemel MB. Lactose intolerance among different ethnic groups. Section of Neonatology Department of Pediatrics Medical College of Georgia Augusta, GA 2011 Des:4
- [2] Solaeman EJ. Mengatasi diare di rumah: waspadai tanda bahaya. *Farmacia* Mar 2014;13(8):58.
- [3] NIH, 2014. Lactose Intolerance. NIH Publication No. 14-7994
- [4] Yuniati, Heru. Kemampuan Fermentasi Bakteri *Lactobacillus bulgaricus* untuk menghasilkan Susu Rendah Laktosa dari Susu yang Rusak. *Bul. Penelit. Kesehat*, Vol. 40, No. 1, Maret 2012 : 11-18.
- [5] Jokar, A., and A. Karbassi. 2011. In-house production of lactose hydrolyzed milk by β -

- Galactosidase from *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Agr. Sci. Techn.* 13: 577-584.
- [6] Li, L., M. Zhang, Z. Jiang, L. Tang, and Q. Cong. 2009. Characterization of a thermostable family 42 β -galactosidase from *Thermotoga maritima*. *Food Chemistry*.112: 844-850.
- [7] Mozumder, N.H.M.R., M. Akhtarruzzaman, M.A. Bakr, and M. Tuj Zahra. 2012. Study on isolation and partial purification of lactase (β -galactosidase) enzyme from *Lactobacillus* bacteria isolated from yoghurt. *J. Sci. Res.* 4: 239-249.
- [8] Anisha, G.S., 2017. Current Developments In Biotechnology And Bioengineering. Government College For Women, Trivandrum, Kerala. India.
- [9] Leksmono, C.S., Manzoni, C., Tomkins, J.E., Lucchesi, W., Cottrell, G. and Lewis, P.A. (2018). Measuring Lactase Enzymatic Activity in the Teaching Lab. *Journal of Visualized Experiments*, (138).
- [10] Chen, W., Chen, H., Xia, Y., Zhao, J., Tian, F. and Zhang, H. (2008). Production, Purification, and Characterization of a Potential Thermostable Galactosidase for Milk Lactose Hydrolysis from *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of Dairy Science*, 91(5), pp.1751–1758.
- [11] Kolusheva, T. (2011). Fast Complexometric Method For Analysis Of Reducing Sugars Obtained During Starch Hydrolysis. *Marinova Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, [online] 46(1), pp.75–80.
- [12] Bayer, tt. Bayer Diastix Reagent Strips For Urinalysis (<https://www.totaldiabetessupply.com/products/bayer-diastix-reagent-strip-for-urine-glucose-50ct> diakses pada 18 September 2019)