

## Purifikasi Parsial dan Karakterisasi $\beta$ -Galactosidase dari *Lactobacillus Plantarum* Strain D-210

### *Partial Purification and Characterization of $\beta$ -Galactosidase from *Lactobacillus Plantarum* Strain D-210*

Nur Nunu Prihantini<sup>1</sup>, Tatik Khusniati<sup>2</sup>, Maria Bintang<sup>1</sup>, Abdul Choliq<sup>2</sup>, Sulistiani<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Christian University of Indonesia, Jakarta

<sup>2</sup>Field of Microbiology, Research Center for Biology, Indonesian Institute of Sciences

**KATA KUNCI**  *$\beta$ -galaktosidase; purifikasi parsial; aktivitas total; inhibitor galaktosidase*  
**KEYWORDS**  *$\beta$ -galactosidase; partial purification; total activity; galactosidase inhibitor*

**ABSTRAK** *Pemurnian parsial dan karakterisasi  $\beta$ -galaktosidase dari *Lactobacillus plantarum* strain D-210 belum dilaporkan. *L. plantarum* strain D-210 ditemukan sebagai bakteri penghasil  $\beta$ -galaktosidase sebagian dimurnikan dengan dialisis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas optimum dalam 24 jam dengan dan total protein adalah 0,454 mg/ml pada pH 6.5 aktivitas enzim 252,341 U/ml, dan suhu 45°C dengan aktivitas 0,582 U/ml. Total aktivitas  $\beta$ -galaktosidase *L. plantarum* strain D-210 adalah 138,396 U dan endapan dengan amonium sulfat dicapai pada 40% - 50% dengan aktivitas total 87,030 U. Setelah dialisis, aktivitas total adalah 50,420 U. Penghambat  $\beta$ -galaktosidase adalah Hg dan Cu dengan aktivitas relatif adalah 56,82% dan 1,04%, sedangkan aktivator adalah Mg, Mn, Ca, Co, Zn.  $V_{maks}$  dari enzim adalah 0.093  $\mu$ mol/menit dan  $K_M$  enzim  $\beta$ -galaktosidase *L. plantarum* adalah 0,491 mM. Berdasarkan karakteristik  $\beta$ -galaktosidase, dapat disimpulkan bahwa *L. plantarum* strain D-210 adalah bakteri baik dan unggul yang dapat memproduksi  $\beta$ -galaktosidase. Studi lebih lanjut diperlukan untuk mengeksplorasi kemungkinan menggunakan bakteri ini dalam pengolahan susu pada bayi dengan intoleransi laktosa.*

**ABSTRACT** *Partial purification and characterization of *Lactobacillus plantarum* strain D-210  $\beta$ -galactosidase has not been reported yet. *L. plantarum* strain D-210 known as bacteria producing  $\beta$ -galactosidase was partially purified by membrane dialysis. The results showed that optimum activity in 24 hour with total protein yield 0.454 mg/ml at pH 6.5 the enzyme activity was 252.341 U/ml, and at 45°C the activity was 0.582 U/ml. The total activity of  $\beta$ -galactosidase *L. plantarum* strain D-210 was 138.396 U and precipitated by sulphate ammonium at 40%-50% with total activity was 87.030 U. Following dialysis, the total activity was 50.420 U. The inhibitors of  $\beta$ -galactosidase were Hg and Cu with relative enzyme activities of 56.82% and 1.04% respectively, while the activators were Mg, Mn, Ca, Co, Zn.  $V_{max}$  of the enzyme was 0.093  $\mu$ mol/min and  $K_M$  was 0.491 mM. Based on the characteristics of the enzyme, it*

*can be concluded that L. plantarum strain D-210 was a good  $\beta$ -galactosidase producing bacteria. Further studies are required to explore the possibility of using this bacteria in milk processing for lactose intolerance babies.*

Seiring dengan kemajuan teknologi dewasa ini, pemanfaatan enzim di berbagai sektor kehidupan sangat luas. Peran enzim sebagai biokatalis untuk menunjang pengembangan industri dan pangan fungsional bahan tambahan kepentingan rumah tangga dan farmasi meningkat dengan tajam. Meskipun demikian, pengadaan enzim khususnya dalam industri di Indonesia masih diperoleh dari impor. Oleh karena itu, sumber-sumber enzim terutama enzim  $\beta$ -galaktosidase (EC 3.2.1.2.3) yang didapatkan dari bahan-bahan hayati lokal, diharapkan dapat mengurangi impor enzim. Penerapan enzim  $\beta$ -galaktosidase dalam kehidupan, cukup beragam. Enzim ini terutama digunakan dalam produk-produk pangan fungsional (terutama "fermented and probiotic milk products"), dan farmasi (terutama produk suplemen berkhasiat obat untuk penanggulangan penderita "lactose intolerance"). Enzim ini digunakan juga untuk biosintesis galaktooligosakarida dan laktulosa, yang merupakan senyawa-senyawa prebiotik, pemacu pertumbuhan mikroba probiotik, yang penting dalam keseimbangan mikroflora dalam usus pencernaan manusia (Khusniati, 2010).

Pada manusia,  $\beta$ -galaktosidase berguna untuk mengubah laktosa menjadi glukosa dan galaktosa. Laktosa merupakan karbohidrat utama pada susu dengan jumlah 4.7% dari total susu (Chaplin, 2004) dan menyediakan energi bagi tubuh setelah terlebih dahulu diuraikan menjadi glukosa dan galaktosa agar dapat diserap oleh usus. Pada keadaan tertentu seseorang tidak dapat mencerna laktosa menjadi glukosa dan galaktosa dikarenakan rendahnya aktivitas  $\beta$ -galaktosidase pada *brush border* usus halus

yang dikenal sebagai intoleransi laktosa (Marsh dan Riley, 1998). Enzim  $\beta$ -galaktosidase banyak digunakan untuk biosintesis galaktooligosakarida dan laktulosa yang merupakan senyawa prebiotik, pemacu pertumbuhan mikroba probiotik yang terpenting dalam keseimbangan mikroflora dalam usus pencernaan manusia. Manfaat lain dari  $\beta$ -galaktosidase adalah untuk mengkonversi limbah industri susu hewani menjadi substrat untuk bioindustri (Gonzales Siso, 1996). Terkait dengan penderita intoleransi laktosa, susu dapat dimodifikasi dengan ultrafiltrasi, fermentasi dan hidrolisis. Proses ultrafiltrasi adalah untuk menghilangkan makromolekul nutrisi berbobot besar seperti laktosa dan protein, sehingga ultrafiltrasi dapat mengurangi bobot nutrisi (Fox dan McSweeney, 1981). Hidrolisis laktosa yang dilakukan secara enzimatis menggunakan  $\beta$ -galaktosidase dapat menghidrolisis laktosa menjadi glukosa dan galaktosa (Winarno, 1999) tanpa mengurangi bobot nutrisi. Dalam hal ini telah lama dikenal pemanfaatan bakteri dalam fermentasi bahan makanan antara lain bakteri asam laktat. Wood (1992) menyatakan bahwa kriteria bakteri asam laktat (BAL) antara lain gram positif, katalase negatif, berbentuk batang atau bulat dapat bersifat homofermentatif ataupun heterofermentatif. Beberapa keunggulan yang dimiliki BAL yaitu meningkatkan nilai cerna pada makanan fermentasi karena dapat melakukan pemotongan pada bahan makanan yang sulit dicerna.

*Correspondence:*

Nur Nunu Prihantini, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Christian University of Indonesia Jakarta, Jalan Mayjen Sutoyo No.2, Cawang, Jakarta Timur 13630, Email: nunuprihantini23@gmail.com

## BAHAN DAN CARA KERJA

*L. plantarum* strain D-120 yang merupakan bakteri indigenus asal dari fermentasi tradisional yang diisolasi dan diidentifikasi secara molekular dan diperoleh dari "working culture" Mikrobiologi, LIPI dan di "subculture" menggunakan media MRS (Man Rogose Sharpe) (Man *et al.*, 1960).

### Produksi $\beta$ -Galaktosidase (Wang dan Sakakibara, 1997)

Sebanyak 2% inokulum Bakteri *L. plantarum* strain D-210 dengan kerapatan optik 0,7 setara dengan  $1.40 \times 10^{10}$  sel/ml diinokulasikan ke dalam 1000 ml media produksi yang telah steril, diinkubasi pada suhu 37°C. Kemudian, sel dipanen setelah inkubasi selama 18 jam (waktu produksi  $\beta$ -galaktosidase optimum). Setelah itu, cairan disentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm (15.880 g) selama 15 menit pada suhu 4°C. Peletnya dicuci sebanyak dua kali dengan buffer fosfat 0,05 M pH 6,5. Setelah itu, pelet yang diperoleh dilarutkan dalam 30 ml buffer fosfat 0,05 M pH 6,5 dan dilakukan pemecahan sel dengan sonikator 50 kHz selama 5 menit pada suhu 4°C. Suspensi sel disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim  $\beta$ -galaktosidase.

### Pengendapan dengan Amonium Sulfat (Scopes, 1987)

Ekstrak kasar  $\beta$ -galaktosidase sebanyak 20 ml diendapkan menggunakan amonium sulfat. Amonium sulfat ditambahkan secara bertahap dengan berbagai konsentrasi yaitu 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, dan 70%, lalu diaduk dengan *magnetic stirer* secara perlahan selama 1 jam. Setelah itu, campuran disentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm selama 15 menit dengan suhu 4°C. Endapan enzim dipisahkan dan dilarutkan

dalam 1 mL bufer fosfat 0.05 M pH 6.5. Aktivitas yang tinggi menunjukkan persentase kejenuhan amonium sulfat yang optimum.

### Dialisis (Bintang, 2011)

Membran Selofan yang mengandung sejumlah kecil enzim dibasahi dan dididihkan selama 30 menit dalam alkali EDTA ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  10 g/L, EDTA 1 mmol/L) selanjutnya tiriskan dan dinginkan setelah didinginkan tabung-tabung tersebut dicuci dengan aquades. Salah satu ujung membran Selofan diikat dan enzim dimasukkan ke dalam kantung dialisis lalu kedua ujung diikat. Kantung dialisis dimasukkan ke dalam buffer fosfat 0,01 M pH 6,5 sambil digoyang dengan pengaduk bermagnet dengan kecepatan 100 rpm setelah 1 jam ganti buffer, putar lagi setelah 1 jam diganti lagi untuk selanjutnya didialisis yang dilakukan pada suhu 4°C selama 24 jam.

### Penentuan Kadar Protein (Bradford, 1976)

Enzim  $\beta$ -galaktosidase diambil sebanyak 100  $\mu\text{l}$  ditambahkan 5 ml larutan *coomassie brilliant blue* 0.1%. Larutan divorteks dan didiamkan selama 5 menit lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 595 nm. Pembuatan kurva standar protein yang digunakan adalah *bovine serum albumin* (BSA) dengan berbagai konsentrasi dari 0.005 - 1.25 mg/ml serta perlakuan yang sama dengan penentuan kadar protein.

### Uji Aktivitas Enzim $\beta$ -galaktosidase (Modifikasi Lu *et al.*, 2009).

Uji aktivitas enzim dilakukan dengan cara sebanyak 1.000  $\mu\text{l}$  buffer fosfat 0.1 M pH 7 dan 100  $\mu\text{l}$  enzim dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu diinkubasi pada suhu 35°C selama 5 menit. Kemudian tambahkan 200  $\mu\text{l}$  ONPGal 2 mg/ml dan diinkubasi pada suhu 35°C selama 10 menit. Pada menit ke-10 ditambahkan 1.000  $\mu\text{l}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 M untuk

menghentikan reaksi. Larutan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV VIS pada  $\lambda$  420 nm. Kemudian dilakukan pembuatan kurva standar dengan cara membuat konsentrasi *O*-Nitrofenol (ONP) dari 0 - 0.500  $\mu$ mol dengan selang 0.100  $\mu$ mol yang dilarutkan dalam buffer fosfat 0.01 M pH 7. Sebanyak 1000 $\mu$ l buffer fosfat 0.1 M pH 7 dan 100  $\mu$ l akuades dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 200  $\mu$ l ONP berbagai konsentrasi, kemudian diinkubasi pada suhu 35°C selama 10 menit. Selanjutnya terhadap campuran ditambahkan 1.000  $\mu$ l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M. Larutan divorteks dan intensitas warna kuning yang terbentuk diukur adsorbansinya pada  $\lambda$  420 nm. Hasil pembacaan aktivitas  $\beta$ -galaktosidase sampel akan diplotkan pada hasil kurva standar. Satu unit aktivitas enzim  $\beta$ -galaktosidase dinyatakan dalam banyaknya enzim yang diperlukan untuk menghasilkan 1  $\mu$ mol ONP dari substrat ONPGal per menit pada kondisi percobaan.

#### Karakterisasi $\beta$ -Galaktosidase (Lu *et al.*, 2009)

Karakterisasi enzim meliputi suhu optimum, pH optimum, dan efek ion logam. Enzim diujikan pada suhu inkubasi (25-45°C) dengan selang 5°C, dan pH pada kisaran pH 5.5-8.5 selang 0.5 diinkubasi selama 5 menit sebelum ditambahkan ONPGal 4 mg/ml.

Enzim diujikan pada berbagai suhu dan pH, diinkubasi selama 1 jam, kemudian ditambahkan ONPGal 4mg/ml dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C, ion-ion logam yang digunakan (Hg<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>) disiapkan pada konsentrasi 0.01 M. Untuk aktivitas enzim pada berbagai konsentrasi substrat dilakukan

dengan cara sebanyak 1.000  $\mu$ l buffer fosfat 0,1 M pH optimum, 100  $\mu$ l enzim dan substrat ONPGal yang diujikan pada konsentrasi 0, 1, 2, 4, 5 mg/ml dan waktu inkubasi 5-20 menit selang 0.5 mg/ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian campuran diinkubasi selama 25 menit dengan suhu optimum. Setiap 5 menit tambahkan 1.000  $\mu$ l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M untuk menghentikan reaksi dan kemudian larutan dianalisis dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada  $\lambda$  420 nm.

## HASIL

#### Optimasi Waktu Produksi Enzim Galaktosidase

Produksi optimum  $\beta$ -galaktosidase *L.plantarum* strain D-210 tercapai pada jam ke-24 dimana jumlah ONP paling tinggi sekitar 13.302  $\mu$ mol, serta kadar protein sebesar 0.454 mg/ml. Produksi  $\beta$ -galaktosidase mengalami penurunan pada jam ke-36 sampai ke-48 dimana pada jam ke-36 jumlah produk yang dihasilkan sebesar 9.0542  $\mu$ mol dan makin berkurang seiring dengan pertambahan pertambahan waktu pada jam ke-48 sebesar 2.673  $\mu$ mol (Tabel 1).

Aktivitas  $\beta$ -galaktosidase meningkat pada jam ke-24 dengan aktivitas sebesar 27.669 U/mg, dan pertumbuhan optimum pada jam ke-24 serta *optical density* optimum sebesar 1.984 dengan jumlah sel 1.81x10<sup>-8</sup> sel/ml (Tabel 2).

#### Penentuan pH Optimum

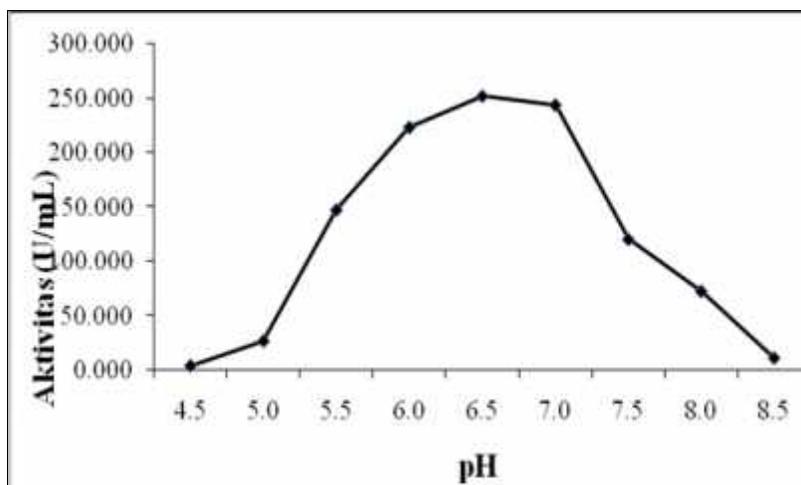
Pada gambar 1 terlihat bahwa pada kondisi mendekati pH 6.5 (pH 5 - 8) aktivitas  $\beta$ -galaktosidase *L. plantarum* strain D-210 cenderung mengalami peningkatan dan mencapai optimum pada pH 6.5 dengan nilai aktivitas sebesar 0.822 U/ml.

Tabel 1. Produksi  $\beta$ -galaktosidase *L. plantarum* strain D-210

Jam Ke-	ONP( $\mu$ mol)	Absorban		Absorban rerata	Kadar Protein(mg/ml)
		Ulangan1	Ulangan2		
0	0	0	0	0	0
6	0,529	0,069	0,070	0,062	0,017
12	4,713	0,073	0,051	0,062	0,436
18	6,496	0,084	0,085	0,085	0,213
24	13,302	0,084	0,087	0,087	0,454
30	12,837	0,073	0,084	0,084	0,260
36	9,054	0,119	0,118	0,118	0,378
42	4,093	0,060	0,054	0,054	0,318
48	2,673	0,324	0,346	0,346	0,260

Tabel 2. Aktivitas  $\beta$ -galaktosidase *L. plantarum* strain D-210 dan Jumlah sel

Jam Ke-	Jumlah Sel	Optical density	Aktivitas(U/mg)
0	$1.18 \times 10^{10}$	0,013	0
6	$2.28 \times 10^9$	0,250	1,154
12	$1.72 \times 10^8$	1,884	9,238
18	$1.79 \times 10^8$	1,959	12,992
24	$1.81 \times 10^8$	1,984	27,669
30	$1.60 \times 10^8$	1,759	24,647
36	$1.58 \times 10^8$	1,729	19,557
42	$1.72 \times 10^8$	1,887	10,151
48	$1.73 \times 10^8$	1,982	5,346



Gambar 1 Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim  $\beta$ -galaktosidase *L. plantarum* strain D-210

### Produksi dan Purifikasi $\beta$ -galaktosidase

Enzim  $\beta$ -galaktosidase *L. plantarum* strain D-210 merupakan enzim intraseluler yang memerlukan pemecahan dinding sel terlebih dahulu. Produksi  $\beta$ -galaktosidase dari *L. plantarum* strain D-210 dapat dilakukan pada media cair yang mengandung laktosa 3% kemudian diinkubasi selama penentuan waktu produksi optimum yaitu pada suhu 37°C selama 24 jam tanpa pengocokan. Bakteri asam laktat ini merupakan bakteri aerotoleran anaerob. Sehingga sel dapat dipanen dengan cara disentrifugasi dengan kecepatan sebesar 10.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C dimana tidak terjadi kerusakan enzim dan pada sel yang berbobot molekul lebih besar akan mengendap dikarenakan adanya gaya gravitasi. Kemudian sel yang didapat dicuci sebanyak dua kali dengan menggunakan buffer fosfat 0.05 M pH 6.5 supaya terhindar dari bahan pengotor lainnya yang berasal dari media. Setelah itu dilakukan pemecahan sel dengan menggunakan gelombang suara tinggi dimana pemecahan dilakukan dalam buffer fosfat 0.05 M pH 6.5 pada suhu 4°C agar enzim tidak rusak, kemudian sel dipisahkan dengan cara disentrifugasi dan dianalisis dengan menggunakan substrat *O*-Nitrofenil- $\beta$ -galaktopiranosida (ONPgal),  $\beta$ -galaktosidase akan menghidrolis ONPgal dan menghasilkan galaktosa dan *O*-nitrofenol (ONP). Berdasarkan hasil percobaan, aktivitas spesifik  $\beta$ -galaktosidase kasar yang diperoleh adalah sebesar 138.396 U/ml (Tabel 3).

Purifikasi selanjutnya dilakukan pengendapan dengan garam ammonium sulfat. Pengendapan dilakukan pada konsentrasi optimum yaitu 40% sampai 50% dengan aktivitas spesifik  $\beta$ -galaktosidase sebesar 238.44 U/mg. Pengendapan dengan garam ammonium sulfat berhubungan dengan jumlah protein yang terbentuk setelah dilakukan purifikasi dimana pengendapan dengan ammonium sulfat ini dilakukan pada kondisi

suhu dingin agar tidak terjadi denaturasi protein. Penambahan garam ammonium sulfat ini dilakukan secara bertahap dan perlahan-lahan agar tercampur merata dan berikatan dengan enzim sehingga dapat terjadi reaksi sempurna. Setelah tercampur pelet ditambahkan buffer agar kondisi enzim stabil. Pengendapan dengan ammonium sulfat ini dengan beberapa variasi konsentrasi yaitu 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%.

Gambar 2 menunjukkan pengendapan enzim dengan ammonium sulfat mempunyai aktivitas spesifik tertinggi pada fraksi 40-50%. Aktivitas spesifik menurun pada fraksi lebih dari 50% karena pada fraksi tersebut lebih banyak enzim yang terendap bukan enzim  $\beta$ -galaktosidase. Aktivitas spesifik  $\beta$ -galaktosidase hasil semipurifikasi ammonium sulfat pada fraksi 40-50% adalah sebesar 238.438 U/ml. Aktivitas spesifik enzim kasar lebih rendah dibandingkan aktivitas spesifik enzim pengendapan dengan ammonium sulfat karena konsentrasi protein yang diperoleh pada enzim kasar lebih tinggi dibandingkan hasil pengendapan dengan ammonium sulfat sebesar 0.365 mg (Tabel 1). Tingkat kemurnian pengendapan dengan ammonium sulfat dan mengalami peningkatan dari 1 kali menjadi 2.97 kali dan rendemen sebesar 62.88%.

Dari Tabel 3 terlihat bahwa proses purifikasi parsial  $\beta$ -galaktosidase dari *L. plantarum* D-210 ini memperlihatkan aktivitas spesifik  $\beta$ -galaktosidase setelah dialisis adalah sebesar 243.574 U/mg, rendemen 36.43%, dan kemurnian meningkat hingga 3.04 kali.

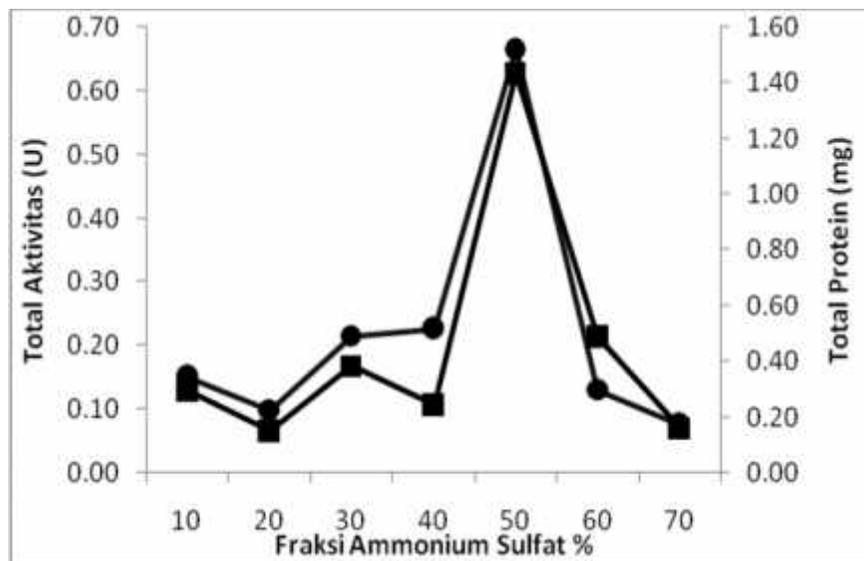
### Karakterisasi $\beta$ -Galaktosidase (Lu *et al.*, 2009)

#### Aktivator dan Inhibitor

Logam Hg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> merupakan inhibitor kuat terhadap  $\beta$ -galaktosidase dari *L. plantarum* strain D-210 sehingga menurunkan aktivitas,  $\beta$ -galaktosidase. Aktivitas relatif Hg sebesar 56.82% dengan aktivitas rata-rata

19.008 U/mg dan Cu sebesar 1.04% dengan aktivitas rata-rata 3.532 U/ml. Logam Hg<sup>2+</sup> dan Cu<sup>2+</sup> bersifat sebagai inhibitor karena merupakan logam berat yang membentuk endapan proteinat sehingga akan memutuskan jembatan disulfida. Sementara itu Mg<sup>2+</sup> Mn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> merupakan akti-vator. Kation

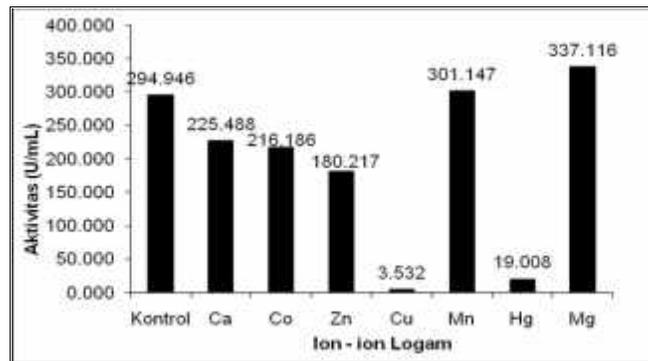
Hg<sup>2+</sup> dan Cu<sup>2+</sup> merupakan inhibitor kuat  $\beta$ -galaktosidase dari *L.plantarum* strain D-210 karena dapat menurunkan aktivitas sebesar 26.35% dan 53.97% dari kontrol (yaitu enzim yang tidak mendapatkan penambahan kation) serta merupakan logam berat (Gambar 3).



Gambar 2 Hasil semipurifikasi dengan garam ammonium sulfat aktivitas total (■) dan total protein (●)

Tabel 3. Purifikasi parsial  $\beta$ -galaktosidase dari *L. plantarum* strain D-210

Tahapan	Total Aktivitas (U)	Total Protein (mg)	Aktivitas Spesifik (U/mg)	Rendemen (%)	Kemurnian (kali)
Enzim Kasar	138.396	1.729	80.043	100.00	1.00
Pengendapan Amonium Sulfat 40%-50%	87.030	0.365	238.438	62.88	2.97
Dialisis	50.420	0.207	243.574	36.43	3.04



Gambar 3 *L.plantarum* strain D-210 terhadap pengaruh logam

### Suhu

Suhu merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi kinerja enzim. Gambar 4 menunjukkan aktivitas  $\beta$ -galaktosidase optimum pada suhu 45°C dengan aktivitas sebesar 0.582 U/ml. Penentuan suhu optimum dan stabilitas suhu dilakukan pada suhu 25–50°C. Gambar 4 menunjukkan peningkatan aktivitas  $\beta$ -galaktosidase dari *L.plantarum* strain D-210 mencapai 45°C. Bila kenaikan temperatur jauh di atas temperatur optimum maka enzim akan terdenaturasi. Dengan aktivitas tertinggi sebesar 0.582 U/ml. Kemudian terjadi penurunan aktivitas pada  $\beta$ -galaktosidase pada suhu 55°C dikarenakan pada suhu tersebut enzim sudah tidak pada suhu optimum dan kehilangan aktivitasnya.

### pH

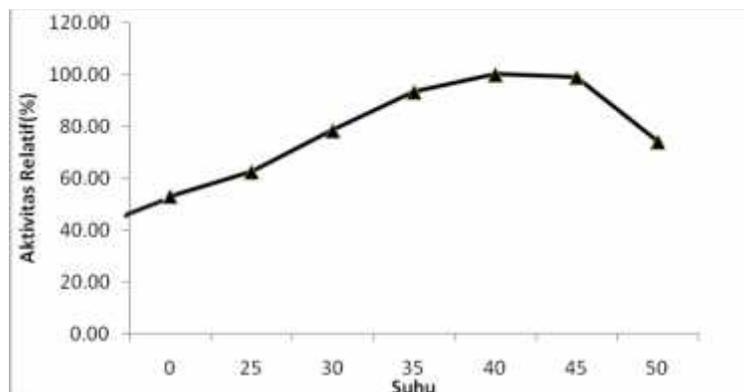
Beberapa keadaan yang mempengaruhi kinerja enzim salah satu diantaranya adalah pH dimana  $\beta$ -galaktosidase bebas

mencapai optimum pada pH 6.5 dengan aktivitas tertinggi sebesar 252.341 U/mg. Gambar 5 menunjukkan optimasi pH  $\beta$ -galaktosidase bebas cenderung lebih rendah yaitu pH 6.5 dengan aktivitas relatif 100%.

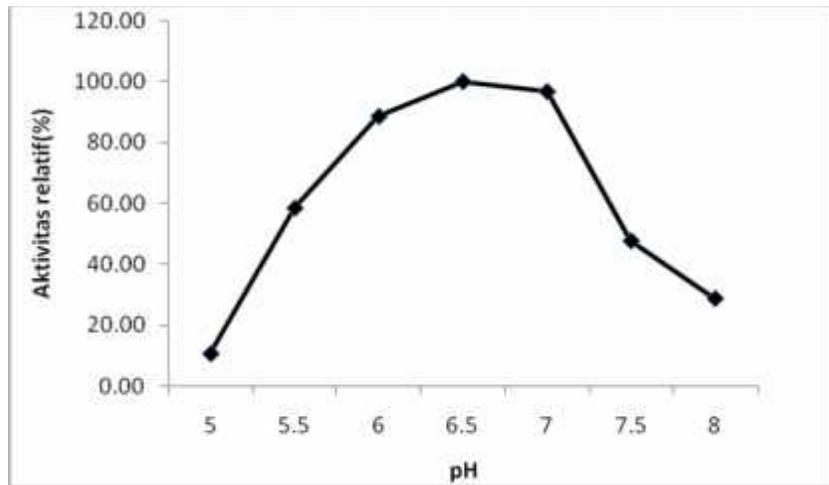
Pada kondisi pH larutan buffer pH 5.5-8.0 dengan selang 0.5 menggunakan 2 jenis buffer yaitu buffer asetat pH 5.5-6.0 dan buffer fosfat pH 6.5-8.0  $\beta$ -galaktosidase menunjukkan dengan aktivitas tertinggi sebesar 0.815 U/ml pada pH 6.5.

### Parameter Kinetik

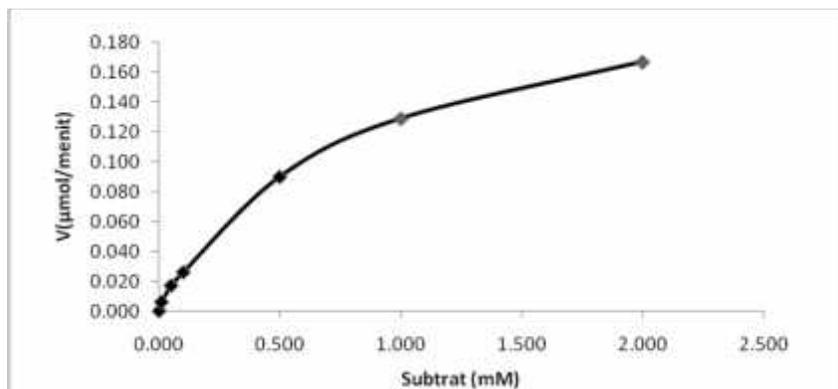
Penentuan nilai  $K_M$  dan  $V_{maks}$  dilakukan dengan pemetaan data menggunakan persamaan Lineweaver Burk (Gambar 6 dan 7). Persamaan Lineweaver Burk adalah  $y = 5.286x + 10.75$  dengan nilai  $R^2$  sebesar 0.971 sehingga kecepatan maksimum aktivitas  $\beta$ -galaktosidase sebesar 0.093  $\mu\text{mol}/\text{menit}$  dan nilai  $K_M$  sebesar 0,491 mM.



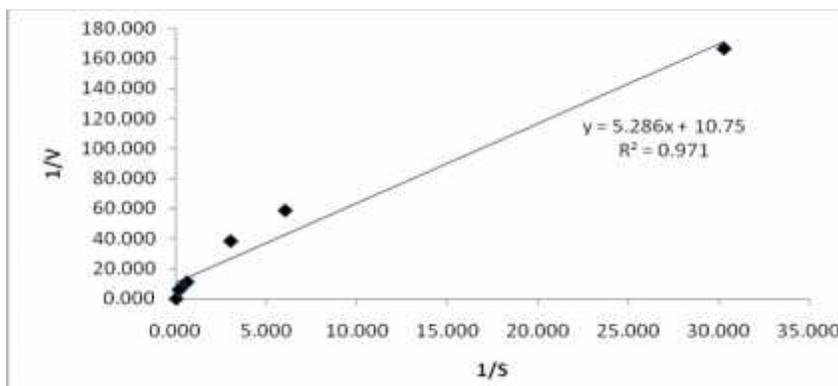
Gambar 4 Profil pengujian pengaruh suhu terhadap aktivitas  $\beta$ -galaktosidase



Gambar 5 Profil hasil pengujian pengaruh pH terhadap aktivitas  $\beta$ -galaktosidase



Gambar 6 Kurva Michaelis Menten  $\beta$ -galaktosidase



Gambar 7 Kurva Lineweaver Burk dari  $\beta$ -galaktosidase

## PEMBAHASAN

### Produksi dan Purifikasi $\beta$ -galaktosidase

Pada saat produksi, bakteri berkembang biak dan menghasilkan enzim yang diinginkan. Setelah itu dilakukan pemanenan pada saat fase eksponensial dimana pada fase ini terjadi pembentukan enzim. Penurunan aktivitas enzim dikarenakan telah terbentuknya produk yang berupa glukosa dan galaktosa. Glukosa dan galaktosa akan menghambat kerja  $\beta$ -galaktosidase dalam menghidrolisis substrat laktosa (Mahoney, 2004).

*L.plantarum* strain D-210 dtumbuhkan pada media *Mann Rogosa Sharpe* (MRS) dengan sumber karbon glukosa diganti dengan laktosa sebanyak 3%. Media ini merupakan media selektif untuk bakteri asam laktat dan laktosa berfungsi sebagai sumber energi, karbon dan inducer enzim  $\beta$ -galaktosidase (Kilara dan Shahani, 1975). Bakteri asam laktat memperoleh energi hanya dari metabolisme gula dan berhubungan dengan komponen fermentasi sehingga habitat pertumbuhannya hanya terbatas pada lingkungan yang menyediakan gula atau bisa disebut lingkungan yang kaya nutrisi (Madigan *et al.*, 2006). Pepton dan *beef extract* berguna sebagai sumber karbon nitrogen dan vitamin untuk pertumbuhan bakteri dalam berkembang biak menghasilkan enzim yang diharapkan. Sementara itu Tween 80 merupakan surfaktan untuk membantu penyerapan nutrisi oleh bakteri asam laktat dan sumber Nitrogen merupakan hal yang penting untuk produksi enzim.

Menurut Wood (1992), kriteria bakteri asam laktat antara lain adalah gram positif, katalase negatif, berbentuk batang atau bulat dan dapat bersifat homofermentatif ataupun heterofermentatif. Menurut Steamer (1979) bakteri asam laktat mempunyai suhu pertumbuhan yang optimum pada kisaran 30-40°C.

Aktivitas  $\beta$ -galaktosidase yang meningkat pada jam ke-24 dengan aktivitas yang diperoleh sebesar 27.669 U/mg menunjukkan pada pada fase ini terjadi proses pembelahan sel yang konstan serta berlipat ganda sehingga produksi enzim meningkat (Pelczar dan Chan, 1986). Menurut Lu *et al.*, (2009)  $\beta$ -galaktosidase intraseluler yang berasal dari bakteri memerlukan pemecahan dinding sel terlebih dahulu. Hasil penelitian Chen *et al.*, (2008) menyebutkan bahwa pengendapan dengan amonium sulfat pada fraksi 65% mampu meningkatkan aktivitas spesifik  $\beta$ -galaktosidase dari *Bacillus stearothermophilus* sebesar 80.3 U/mg. Sementara itu Shaikh *et al.*, (1999) menunjukkan adanya peningkatan aktivitas spesifik  $\beta$ -galaktosidase dari *Rhizomucor* sp pada pengendapan amonium sulfat 90% sebesar 10.5 U/mg.

### Purifikasi Parsial $\beta$ -Galaktosidase

Purifikasi parsial *L.plantarum* strain D-210 dilakukan dengan pengendapan menggunakan ammonium sulfat dan diikuti dengan dialisis dengan menggunakan membran dialisis. Pengendapan dengan amonium sulfat berhubungan dengan jumlah protein yang terbentuk, dimana pada kisaran protein 40% sampai 50% terjadi peningkatan aktivitas  $\beta$ -galaktosidase. Pemberian ammonium sulfat dilakukan pada suhu dingin agar tidak terjadi denaturasi protein. Pengendapan dengan ammonium sulfat ternyata menghasilkan total protein yang lebih tinggi dibandingkan dengan enzim kasar karena pada tahap semi-purifikasi ini enzim yang diharapkan yaitu enzim  $\beta$ -galaktosidase sudah bisa diperoleh dengan kemurnian yang lebih tinggi hasilnya dari enzim kasar. Hasil penelitian Chen *et al.*, (2008) menyebutkan bahwa pengendapan dengan amonium sulfat pada fraksi 65% mampu meningkatkan aktivitas spesifik  $\beta$ -galaktosidase dari *Bacillus stearothermophilus* sebesar 80.3 U/mg. Menurut Shaikh *et al.*, (1999) pada pengendapan ammonium sulfat

90% terjadi peningkatan aktivitas spesifik  $\beta$ -galaktosidase dari *Rhizomucor* sp sebesar 10.5 U/mg.

### Karakterisasi $\beta$ -galaktosidase *L.plantarum* strain D-210

Menurut Dawn *et al.*, (2000) ion-ion logam berperan dalam proses katalitik yang berfungsi sebagai elektrofil (gugus penarik-elektron) dimana ion logam membantu pengikatan substrat, menerima dan memberi elektron dengan mengubah distribusi muatan parsial pada molekul substrat. Laju suatu reaksi enzimatik sangat dipengaruhi oleh ion-ion logam tertentu yang diperlukan untuk meningkatkan aktivitasnya. Karakterisasi enzim dipengaruhi oleh aktivator dan inhibitor karena dengan adanya aktivator maka proses katalis enzim dalam mengubah substrat akan semakin cepat, sedangkan inhibitor senyawa yang menurunkan kecepatan reaksi enzim serta menghambat afinitas enzim terhadap substrat. Kation  $Hg^{2+}$  dan  $Cu^{2+}$  merupakan inhibitor kuat  $\beta$ -galaktosidase dari *L.plantarum* strain D-210 karena dapat menurunkan aktivitas sebesar 26.35% dan 53.97% dibanding kontrol (yaitu enzim yang tidak mendapatkan penambahan kation) serta merupakan logam berat. Menurut Suriawiria (2005) ion-ion logam berat dapat bereaksi dengan gugusan senyawa sel,  $Hg^{2+}$  dapat bergabung dengan gugusan sulfhidril (Sh) pada enzim dan akan menghambat kerja enzim yang dapat memutuskan jembatan disulfida sehingga merupakan inhibitor non kompetitif.

### pH

Penentuan pH optimum diperlukan karena reaksi enzim dipengaruhi oleh pH. pH optimum berkaitan dengan kinerja enzim dimana *L.plantarum* strain D-210 merupakan bakteri yang normofilik dengan kondisi optimum pada pH 6 sampai 6.5. Kecepatan reaksi meningkat seiring dengan peningkatan

pH. Pada kondisi asam terjadi ionisasi gugus takap aktif oleh karena peningkatan  $H^+$  dan pembentukan ikatan hidrogen serta hilangnya aktivitas pada sisi basa akibat ionisasi residu asam amino pada enzim yang tidak sesuai (Dawn *et al.*, 2000). Enzim memiliki pH optimum yang menyebabkan aktivitas maksimal pemberi atau penerima proton yang penting pada sisi katalitik enzim dalam tingkat ionisasi yang diinginkan (Lehninger, 1994). Aktivitas katalitik enzim di dalam sel diatur sebagian oleh perubahan pH medium lingkungan dengan aktivitas sebesar 252.341 U/ml. Menurut Iswari dan Yuniastuti, (2006) jika pH rendah atau kadar  $H^+$  meningkat maka gugus yang bermuatan negatif menjadi terprotonisasi, karena menetralkan muatan negatif, dan jika pH meningkat atau konsentrasi  $OH^-$  meningkat maka gugus yang bermuatan positif berdisosiasi sehingga dinetralkan. Aktivitas enzim dapat berubah akibat perubahan pH lingkungan dikarenakan ionisasi enzim, substrat atau kompleks enzim substrat (Winarno, 1999). Medium fermentasi untuk memproduksi enzim diketahui pada kisaran pH 3,4,5,6,7,8 dan aktivitas tertinggi  $\beta$ -galaktosidase ditemukan pada pH 5 dan mengalami penurunan sampai pH 8. Rajoke *et al.*, (2003) mengatakan bahwa produksi  $\beta$ -galaktosidase oleh *Klumeromyces marxians* berlangsung optimal pada pH 5.5.

### Suhu

Karakterisasi suhu *L.plantarum* strain D-210 memiliki suhu optimum berkisar 40 sampai 45°C. Menurut Matheus dan Rivas (2003) suhu optimum  $\beta$ -galaktosidase dari *Klumeromyces lactis* untuk memproduksi enzim adalah 30.3°C dengan waktu fermentasi 18.5 jam, dan suhu optimum untuk bakteri asam laktat seperti *Lactobacillus murimus* sekitar 45°C (Macias *et al.*, 1983). Sementara itu suhu optimum bakteri *Lactobacillus bulgaricus* adalah sekitar 55

sampai 57°C (Itoh *et al.*, 1980). Penentuan suhu optimum dan stabilitas suhu dilakukan pada suhu 25 sampai 50°C. Menurut Wang *et al.*, (2004) diperlukan suhu optimum 35°C untuk produksi maksimum enzim  $\beta$ -galaktosidase dari *Klumeromyces marxianus*.

Penurunan aktivitas  $\beta$ -galaktosidase bebas pada suhu 45°C terjadi karena pada suhu tersebut enzim sudah terdenaturasi dan kehilangan aktivitasnya. Pada  $\beta$ -galaktosidase amobil terjadi penurunan aktivitasnya pada suhu 40°C dan terus mengalami penurunan serta kehilangan aktivitasnya. Hasil penelitian Yuningtias (2008) menyebutkan bahwa  $\beta$ -galaktosidase dari bakteri *Lactobacillus bulgaricus* aktif pada suhu optimum 43°C. Hal ini menunjukkan bahwa enzim  $\beta$ -galaktosidase dari *L.plantarum* strain D-210 aktif pada suhu yang lebih rendah jika dibandingkan dengan bakteri lain penghasil enzim ini. Oleh karena itu, konsumsi energi yang diperlukan lebih rendah, sehingga menguntungkan untuk digunakan pada bioindustri. Menurut Suriawiria (2005) dalam reaksi kimia kenaikan temperatur akan menaikkan kecepatan reaksi dikarenakan proses metabolisme pada dasarnya adalah reaksi kimia. Meskipun demikian kenaikan tersebut terjadi sampai nilai batas optimum dalam mempercepat proses metabolisme, sedangkan temperatur tinggi melebihi batas maksimum akan menyebabkan denaturasi protein dan enzim yang berakibat terhentinya reaksi.

#### Parameter Kinetik

Parameter kinetik pada  $\beta$ -galaktosidase *L.plantarum* strain D-210 memperlihatkan adanya peningkatan kecepatan reaksi. Konsentrasi enzim tetap dengan pertambahan konsentrasi substrat akan menaikkan kecepatan reaksi pada batas konsentrasi tertentu dan tidak akan meningkatkan kecepatan reaksi lagi walaupun konsentrasi substrat diperbesar (Poedjiadi dkk, 1994).

Dengan kata lain konsentrasi substrat rendah menyebabkan kecepatan reaksi yang rendah tetapi kecepatan akan meningkat dengan meningkatnya konsentrasi substrat, dan tercapai titik batas setelah titik ini dilampaui. Hasil penelitian Chandra (2010) menyatakan bahwa galaktosidase dari *Lactobacillus bulgaricus* mempunyai parameter kinetik  $V_{maks}$  0.385  $\mu\text{mol}/\text{menit}$  dan  $K_M$  1.075 mM.

#### SIMPULAN

*Lactobacillus plantarum* strain D-210 merupakan bakteri penghasil enzim  $\beta$ -galaktosidase yang terletak intraseluler. Waktu inkubasi optimum jam ke-24 dengan *optical density* 1.984, jumlah sel 1.81394E-08 sel/ml, protein total 0.454 mg/ml dan suhu optimum 45°C dengan aktivitas 0.582 U/ml dan pH 6.5 dengan aktivitas 252.341 U/ml. Purifikasi parsial  $\beta$ -galaktosidase menghasilkan aktivitas spesifik sebesar 243.574 U/mg dengan rendemen 36.43% dan tingkat kemurnian sebesar 3.04 kali dari enzim kasar. Logam Hg dan Cu merupakan inhibitor  $\beta$ -galaktosidase *L.plantarum* strain D-210, sedangkan Mg, Mn, Ca, Co, Zn merupakan aktivator. Enzim  $\beta$ -galaktosidase secara berturut-turut memiliki nilai  $V_{maks}$  sebesar 0.093  $\mu\text{mol}/\text{menit}$  dan  $K_M$  sebesar 0.491 mM.

#### Ucapan terimakasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Proyek PKPP dan DIPA Tematik, 2012-2013, Puslit Biologi, LIPI atas pemberian dana dalam penelitian ini, beserta Sdri Neneng Karimaryati dan Sdri Febriati Rahayu atas bantuan teknis dalam penelitian ini.

#### KEPUSTAKAAN

- Bintang M 2011. Teknik Penelitian Biokimia. Jakarta: Erlangga, edisi 1:79  
Bradford MM 1976. Rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein

- utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* 72:248-254.
- Chandra AB 2010. Karakterisasi dan Kinetka Enzimatik  $\beta$ -galaktosidase Isolat Bakteri AV-1 pada Susu Pasteurisasi [Skripsi]. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
- Chaplin M 2004. The Use of lactases in dairy industry <http://www.isbu.ac.uk/biology/enztech/lactase/html>
- Chen W, Chen H, Xia Y, Zhao J, Tian F, Zhang H 2008. Production, purification, and characterization of a potential thermostable  $\beta$ -galactosidase for milk lactose hydrolysis from *Bacillus stearothermophilus*. *J Dairy Sci* 91:1751-1758.
- Dawn B, Marks, Allian D, Marks MD, Colleen M Smith, PhD 2000. *Biokimia Kedokteran Dasar Sebuah Pendekatan Klinis*, Penerbit EGC.
- Fox PF, Mc Sweeney PLH 1981. Dairy chemistry and Biochemistry. London Blackie Academic & Professional.
- Gonzales Siso MI. 1996. The Biotechnological utilization of cheese whey. *Areview Bioros Technol*.
- Iswari Retno, Yuniastuti A 2006. *Biokimia*, Graha ilmu, hal: 45
- Itoh T, Ohhashi M, Toba T, Adachi S 1980. Purification and properties of  $\beta$  galactosidase from *Lactobacillus bulgaricus*. *Milchwissenschaft* 35:593-597.
- Khusniati T 2010. Purifikasi, Karakterisasi dan Sifat Hidrolisis Enzim  $\beta$ -Galaktosidase Bakteri Unggul Terseleksi yang Diisolasi dari Buah-buahan di Gunung Salak, laporan penelitian LIPI.
- Kilara A, Shahani KM 1975. Lactase activity of cultured and acidified dairy products. *J. Dairy Sci* 59:2031-235.
- Lehninger AL 1994. Principles of Biochemistry 4rd Edition. Amhrest: Elsevier Science.
- Lu LL, Xiao M, Li ZY, Li YM, Wang FS 2009. A novel transglycosylating  $\beta$ -galactosidase from *Lactobacillus Indigen* B5. *Process Biochemistry* 44: 232-236.
- Macias N de et al. 1983. Isolation and purification of  $\beta$ -galactosidase of *L. murinus* CNRZ313. *Curr Microbiol* 9:99-104.
- Madigan MT, Martinko JM 2006. Brock: Biology of Microorganism. *Pearson Education International*. ISBN 0-13-196893-9 Page.375-377.
- Mahoney RR 2004. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: A review. *Food Chem* 63:147-154.
- Man JC de, Rogosa M, Sharpe ME 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl Bacteriol* 23:130-135.
- Marsh MN, Riley SA 1998. Digestion and Absorption of Nutrients and Vitamins *Sleisenge amd fordtran'Na2CO3 Gastrointestinal and Liver Disease* 26: 1495-1496.
- Matheus and Rivas N 2003. Production and partial characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* grown in deproteinized whey. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 53(2): 194-201.
- Pelczar MJ Jr, Chan ECS 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Volume ke-1. Hadioetomo RS, Imas, T, Tjitrosomo SS, Angka SL, penerjemah; Jakarta UI Pr. Terjemahan.
- Poedjadi A 1995. *Dasar-Dasar Biokimia*, Universitas Indonesia Press hal:159-160.
- Rajoke MI, Samia K, Riaz S 2003. Kinetics and Regulation Studies of the Production of  $\beta$ -Galactosidase from *Klumeromyces marxianus* Grown on Different Substrates. *Food Technol. Biotechnol.* 41(4): 315- 320. eng.2.(4):1
- Scopes RK 1993. Protein Purification. New York: RR Doneley and Sons
- Shaikh SA, Khire JM, Khan MI 1999. Characterization of a thermostable extracellular  $\beta$ -galactosidase from a thermophilic fungus *Rhizomucor* sp. *Biochimica et Biophysica Acta*.1472(1-2):314-322.
- Steamer JR 1979. Lactic acid bacteria. Di dalam: de Fuguredo M.P. & Splittoesser, D.F. *Food Microbiology*. Public Health and Spoilage aspect. Westport: AVI Pub.
- Suriawiria Unus 2005. *Mikrobiologi Dasar*, Papas Sinar Sinanti, Jakarta hal: 111-112.
- Wang D, Sakakibara M 1997. Lactose hydrolysis and  $\beta$  -galaktosidase activity in
- Winarno FG 1999. *Enzim Pangan*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.
- Wood BJB 1992. *The Lactic Acid Bacteria in Health and Deseases*. London: Blackie Academic and Professional.
- Yuningtias 2008. Isolasi dan Karakterisasi  $\beta$ -galaktosidase Bakteri Asam Laktat dari Hasil Fermentasi [Skripsi]. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.