



PERBANDINGAN METODE ISOLASI ENZIM TERHADAP AKTIVITAS ENZIM LAKTASE DARI BAKTERI ASAM LAKTAT (BAL) YANG DI ISOLASI DARI TANGKAI TERUNG UNGU (*Solanum Melongena L*)

Mike Permata Sari

mikepermatasari1411@gmail.com, Institut Kesehatan Hermina

Abstract

Purple eggplant calyx stem have the potential to produce lactase enzymes because they contain lactic acid bacteria (LAB). The β -galactosidase (lactase) enzyme plays a role in converting lactose into galactose and glucose. Deficiency of this enzyme will cause several health complications such as digestive disorders, malnutrition and stunting in children. LAB is a bacteria that can produce β -galactosidase intracellularly. In this study, β -galactosidase from LAB was extracted in two ways, namely physical and chemical. Physical isolation used the sonication method and for chemical isolation used several types of solvents, namely isoamyl Alcohol, Toluene and Toluene-Acetone. The substrate used is oNPG (o-nitrophenol- β -Dgalactopyranoside), where β -galactosidase will hydrolyze the substrate into oNP and β -D-galactose. Based on the highest total protein value of 16 mg/mL and the highest activity of 0.3821U/mL, the Toluene method is better than other methods.

Keywords: β -galaktosidase, Enzyme Isolation, Lactase, Lactic Acid Bateria, *Solanum melongena*, Toluene.

Abstrak

Tangkai terung ungu memiliki potensi sebagai penghasil enzim laktase karena mengandung bakteri asam laktat (BAL). Enzim β -galaktosidase (laktase) berperan dalam mengubah laktosa menjadi galaktosa dan glukosa. Kekurangan enzim ini akan menyebabkan beberapa komplikasi kesehatan seperti gangguan pencernaan, kekurangan nutrisi hingga stunting pada anak. BAL merupakan bakteri yang dapat menghasilkan β -galaktosidase secara intraseluler. Dalam penelitian ini β -galaktosidase dari BAL diekstraksi melalui dua cara yaitu fisika dan kimia. Isolasi fisika menggunakan metode sonikasi dan untuk isolasi kimia menggunakan beberapa jenis pelarut, yaitu isoamyl Alkohol, Toluena dan Toluena-Aseton. Substrat yang digunakan adalah oNPG (o-nitrophenol- β -Dgalactopyranoside), dimana β -galaktosidase akan menghidrolisis substrat menjadi oNP dan β -D-galactose. Berdasarkan nilai protein total yang tertinggi sebesar 16 mg/mL dan aktivitas tertinggi 0,3821U/mL, maka metode Toluena lebih baik dari metode lainnya.

Kata Kunci: β -galaktosidase, Bakteri asam laktat, Isolasi enzim, Lactase, *Solanum melongena*, Toluena.

PENDAHULUAN

Terung ungu (*Solanum Melongena L*) merupakan salah satu buah dari keluarga *Solanaceae* yang tumbuh subur di Indonesia tanpa batasan musim tertentu. Saat ini pemanfaatan terung ungu masih sebatas buah yang dapat dikonsumsi sebagai sayur-mayur karena banyak mengandung nilai gizi. Diperlukan eksplorasi lebih dalam mengenai pemanfaatan buah terung ungu di dalam dunia kesehatan, penelitian sebelumnya telah membuktikan terdapat bakteri asam laktat (BAL) pada tangkai terung ungu. BAL memiliki potensi untuk mensintesis enzim laktase (Amin et al., 2023). Enzim laktase berperan dalam mengubah laktosa menjadi galaktosa dan glukosa, kekurangan enzim ini akan menyebabkan beberapa komplikasi kesehatan seperti gangguan pencernaan, kekurangan nutrisi hingga stunting pada anak (Jasewicz & Wasserman, 1961; Utami et al., 2019).

Upaya menanggulangi kasus intoleransi laktosa maka perlu dilakukan berbagai pengobatan termasuk pemberian suplemen enzim laktase. Selain disintesis di usus halus manusia, enzim laktase juga disintesis oleh mikroorganisme seperti bakteri asam laktat dan beberapa jamur (Akolkar et al., 2005). Bakteri asam laktat (BAL) merupakan salah satu mikroorganisme yang digunakan sebagai produk probiotik untuk memfermentasi makanan, salah satu contoh produknya adalah yogurt (Kolars et al., 1984; Savaiano & Robert, 2020). Selain konsumsi makanan yang mengandung mikroorganisme penghasil enzim laktase, terapi lainnya adalah mengkonsumsi suplemen enzim laktase.

Suplemen enzim laktase adalah sebuah sediaan yang mengandung enzim laktase murni, untuk melakukan pemurnian enzim laktase dari bakteri asam laktat atau mikroorganisme lain



yang dapat mensitesisnya. Langkah awal pemurnian enzim laktase adalah isolasi, enzim laktase merupakan enzim intraseluler sehingga diperlukan proses eksploitasi dalam proses pemurnian enzim. Beberapa metode dilaporkan dapat digunakan dalam proses isolasi enzim dari sel menggunakan metode fisika dan kimia. Metode fisika yang digunakan seperti penghancuran dinding sel, penghilangan supernatant dan sentrifugasi. Isolasi enzim laktase metode kimia menggunakan bahan kimia yang dapat menghancurkan dinding sel seperti alkohol, toluen dan asoamil alkohol. Penelitian ini bertujuan untuk membandingi beberapa metode isolasi enzim laktase terhadap aktivitas enzim, hasil isolasi enzim diuji

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen yang melibatkan berbagai teknologi sederhana untuk mengisolasi enzim dari BAL yang sebelumnya telah diisolasi dari tangkai terung ungu.

Alat

Autoklaf, incubator, sentrifus, sonikator, neraca analitik, *Biosafety Cabinet* (BSC), neraca analitik, thermometer, cawan petri, tabung reaksi, pembakar spirtus, Erlenmeyer, pipet, spatula, gelas ukur, jarum ose, kuvet dan spektrofotometer.

Bahan

Isolat Bakteri asam laktat dalam media MRS Agar yang telah diisolasi dari tangkai terung ungu, substrat oNPG (o-Nitrophenol- β - Dgalactopyranoside) [SRL], isoamyl alkohol, toluen, dan aseton.

Prosedur Kerja

Isolasi Enzim Laktase

Proses selanjutnya adalah isolasi enzim laktase, metode yang digunakan untuk penelitian ialah metode fisika menggunakan alat sonikator dan metode kimia dengan pelarut toluen, toluen aseton dan isoamil alkohol.

Metode Sonikasi

Cara kerja metode sonikasi yaitu biakan disentrifugasi pada kecepatan 4500 rpm selama 30 menit. Biomassa yang diperoleh kemudian ditambahkan dengan buffer fosfat pH 7. Selanjutnya dilakukan sonikasi menggunakan sonikator dengan 30 Hz selama 30 menit. Setelah disonikasi, dilakukan sentrifus kembali suspensi sel dengan kecepatan 4500 rpm, suhu 4°C selama 30 menit.

Metode Toluena

Cara kerja metode toluena yaitu dengan cara menumbuhkan BAL di media cair MRS Broth. Hasil inokulasi tersebut disentrifugasi pada kecepatan 4500 rpm selama 30 menit, kemudian pellet yang diperoleh diberi tambahan buffer fosfat pH 7, selanjutnya ditambahkan penambahan toluena kemudian dilakukan vortex selama 1 menit. Pada tahap ini hasil yang diperoleh adalah enzim laktase yang telah dipisahkan dari bakteri asam laktat.

Metode Isoamil Alkohol

Isolasi metode isoamil alkohol yaitu Pellet yang diperoleh ditambahkan 5 mL buffer Fosfat pH 7 kemudian ditambahkan 200 μ L isoamil Alkohol. Inkubasi selama 12 jam, supernatant (enzim kasar) diperoleh menggunakan sentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 4500 rpm.

Metode Toluena dan Aseton

Isolasi metode Toluena dan aseton yaitu Pellet yang diperoleh ditambahkan 5 mL buffer Fosfat pH 7 kemudian ditambahkan 200 μ L Toluena dan Aseton (9:1). Larutan diinkubasi selama 12 jam, supernatant diperoleh menggunakan sentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 4500 rpm (Andreas Sitepu et al., 2020).



Uji Aktivitas Enzim Laktase

Uji kuantitatif aktivitas enzim laktase bertujuan untuk mengetahui konsentrasi enzim laktase yang dihasilkan dari isolasi BAL tangkai terung ungu. Sebanyak 1000 µl buffer fosfat pH 7 dan 100 µl sampel uji dipipet ke dalam tabung reaksi kemudian inkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C, kemudian ditambahkan 200 µl o-nitrofenil-β-D-galaktopiranosida (OnpGal) 4 mg/mL sebagai substrat dan dilanjutkan inkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C, kemudian ditambahkan larutan yang berperan sebagai stop solution yaitu Na₂CO₃ 1M sebanyak 1000 µl. Selanjutnya pembacaan absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 420 nm. Aktivitas enzim (U/mL) adalah terbentuk produk berupa jumlah o-nitrofenol (oNP) yang dibentuk per menit per mililiter enzim pada suhu 37°C dalam satuan µmol. Penentuan konsentrasi aktivitas enzim dilakukan perbandingan absorbansi dengan persamaan kurva standar laktase menggunakan substrat dengan rentang konsentrasi 0-3 mg/mL. Aktivitas enzim dihitung dengan persamaan (Priadi et al., 2018a).

$$\text{Enzyme Activity} = \frac{\text{Micro mol ONP}}{V \times t}$$

V = sample volume

t = time for incubation

HASIL dan PEMBAHASAN

Perbedaan metode isolasi terhadap aktivitas enzim dan protein total

Dalam penelitian ini dilakukan isolasi BAL dari tangkai terung ungu, setelah dilakukan isolasi BAL dengan MRS Broth dan MRS Agar, dilakukan isolasi enzim menggunakan sonikasi, pelarut toluen, toluen aseton dan isoamil alkohol (Sitepu et al., 2020). Selanjutnya dilakukan uji protein menggunakan metode Bradford. Metode Bradford adalah teknik kolorimetri untuk menentukan kadar total protein. Teknik ini memanfaatkan pewarna Coomassie Brilliant Blue G250 (CBBG), yang berikatan dengan protein dan menghasilkan penyerapan warna yang dapat diukur pada panjang gelombang 595 nm. Protein akan mengikat CBBG ketika asam amino yang ada berada pada pH asam. Proses pengukuran dilakukan dengan menambahkan CBBG ke larutan protein, mengukur penyerapan warna pada λ 595 nm, dan membandingkan hasilnya dengan kurva standar (Yuniarti et al., 2022).

Berdasarkan hasil yang didapat konsentrasi kadar protein total dengan isolasi enzim metode toluen memiliki nilai yang lebih tinggi dibandingkan metode lain yaitu sebesar 16,3 mg/mL.

Tabel 1. Kadar protein total, Aktivitas Enzim dan Aktivitas Spesifik berdasarkan metode isolasi enzim

Metode Isolasi	Aktivitas Enzim (U/mL)
Sonikasi	0,0045
Toluen	0,3821
Toluen Aseton	0,367
Isoamil Alkohol	0,03506

Dalam penelitian ini, dilakukan penentuan metode ekstraksi fisika dan kimia dengan menggunakan berbagai pelarut yang memiliki tingkat kepolaran berbeda-beda. Tujuannya adalah untuk mengidentifikasi pelarut yang dapat berinteraksi dengan membran sel tanpa menyebabkan denaturasi pada β-galaktosidase, dengan cara mengukur aktivitas enzim yang dihasilkan (Priadi et al., 2018b).

BAL adalah bakteri gram positif yang memproduksi β-galaktosidase secara intraseluler. Bakteri gram positif memiliki dinding sel yang terdiri dari peptidoglikan, lipid, dan polisakarida



seperti asam teikoat. Membran sel bakteri memiliki lipid dengan sisi polar dan nonpolar, yang berfungsi melindungi bagian dalam sel (Carr et al., 2002). Berdasarkan hasil yang diperoleh dari ke empat metode di dapat hasil aktivitas enzim tertinggi yang menandakan besarnya aktivitas enzim yaitu 0,3821 U/mL pada metode toluen, hal ini karena toluen merupakan pelarut polar yang dapat berinteraksi dengan dinding sel BAL dan menyebabkan enzim laktase dapat terisolasi dengan baik. Terbukti pada penelitian ini pelarut toluene tidak mendenaturasi enzim laktase. Metode isolasi menggunakan toluene aseton juga memiliki hasil yang baik walaupun hasil yang diperoleh tidak sama baikya dengan metode toluen. Sedangkan metode isolasi menggunakan pelarut isolamil alkohol memperoleh hasil tidak optimal karena isoamil alkohol merupaka pelarut semi polar sehingga kurang optimal berinteraksi dengan dinding BAL dan cenderung mendenaturasi enzim laktase. Metode isolasi menggunakan sonikator juga tidak memperoleh hasil yang baik disebabkan suhu yang tidak optimal pada saat proses isolasi enzim menggunakan sonikator yang tidak memiliki pengaturan suhu (Andreas Sitepu et al., 2020).

PENUTUP

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang didapat aktivitas enzim tertinggi yang dihasilkan oleh BAL dari tangkai terung ungu menggunakan berbagai metode isolasi ialah 0,3821 U/mL menggunakan metode toluene, karena menghasilkan aktivitas enzim yang lebih tinggi dari pada metode isolasi enzim lainnya. Hal ini disebabkan toluene memiliki sifat polar yang dapat berinteraksi baik dengan dinding sel BAL dan enzim laktase dapat terekstraksi lebih tinggi.

Saran

Untuk penelitian selanjutnya 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.

DAFTAR PUSTAKA

- Akolkar, S. K., Sajgure, A., & Lele, S. S. (2005). Lactase production from *Lactobacillus acidophilus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(6–7), 1119–1122. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-0079-9>
- Amin, A., Olama, A., & Ali, M. (2023). Characterization of an isolated lactase enzyme produced by *Bacillus licheniformis* ALSZ2 as a potential pharmaceutical supplement for lactose intolerance _ Enhanced Reader. *Frontiers In Microbiology*, 1–11.
- Andreas Sitepu, G., Adi Sutanningsih, A., & Siti Djenar, N. (2020). Penentuan Jenis Pelarut Ekstraksi Terbaik dan Pengaruh Waktu Fermentasi Pada Aktivitas β -galaktosidase dari *Lactobacillus lactis*. *IRWNS*, 26–27.
- Carr, F. J., Chill, D., & Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. In *Critical Reviews in Microbiology* (Vol. 28, Issue 4, pp. 281–370). CRC Press LLC. <https://doi.org/10.1080/1040-840291046759>
- Jasewicz, L., & Wasserman, A. E. (1961). Quantitative Determination of Lactase. *Journal of Dairy Science*, 44(3), 393–400. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(61\)89755-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(61)89755-5)
- Kolars, J. C., Levitt, M. D., Aouji, M., & Savaiano, D. A. (1984). Yogurt — An Autodigesting Source of Lactose. *New England Journal of Medicine*, 310(1), 1–3. <https://doi.org/10.1056/nejm198401053100101>
- Priadi, G., Setiyoningrum, F., Afiati, F., Penelitian, P., Lembaga, B., Pengetahuan, I., Jalan, I., Km, R. B., Bogor, C., & Barat, J. (2018a). Enzim β -galaktosidase dari *Leuconostoc mesenteroides* indigenus: ekstraksi, purifikasi parsial dan karakterisasi β -Galactosidase enzyme from indigenus *Leuconostoc mesenteroides*: extraction, partial purification



- and characterization. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indonesia*, 4(2), 184–189. <https://doi.org/10.13057/psnmbi/m040215>
- Priadi, G., Setiyoningrum, F., Afiati, F., Penelitian, P., Lembaga, B., Pengetahuan, I., Jalan, I., Km, R. B., Bogor, C., & Barat, J. (2018b). Enzim β -galaktosidase dari *Leuconostoc mesenteroides* indigenus: ekstraksi, purifikasi parsial dan karakterisasi β -Galactosidase enzyme from indigenous *Leuconostoc mesenteroides*: extraction, partial purification and characterization. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indonesia*, 4(2), 184–189. <https://doi.org/10.13057/psnmbi/m040215>
- Savaiano, D. A., & Robert, W. H. (2020). Yogurt, Cultured Fermented Milk, And Health : s systematic review. *Nutrient Review*, 79(5), 599–614.
- Sitepu, G. A., Putri, E. R. R., & Inayah. (2020). Isolasi enzim laktase untuk mengurangi kadar laktosa susu bagi penderita intoleransi laktosa. *Prosiding The 11th Industrial Research Workshop and National Seminar Bandung*, 11(1), 26–27.
- Utami, R. A., Setiawan, A., & Fitriyani, P. (2019). Identifying causal risk factors for stunting in children under five years of age in South Jakarta, Indonesia. *Enfermeria Clinica*, 29, 606–611. <https://doi.org/10.1016/j.enfcli.2019.04.093>
- Yuniarti, F., Hidayati, W., Setiawati, S., & Nabilah, K. (2022). Isolasi dan Uji Aktivitas Enzim B-Galaktosidase Bakteri Asam Laktat (BAL) dari Fermentasi Buah Sirsak (*Annona muricata* L.). *Al-Kauniah: Jurnal Biologi*, 15(1), 28–35. <https://doi.org/10.15408/kauniah.v15i1.15523>