

Enzim β -galaktosidase dari *Leuconostoc mesenteroides* indigenus: ekstraksi, purifikasi parsial dan karakterisasi

β -Galactosidase enzyme from indigenous *Leuconostoc mesenteroides*: extraction, partial purification and characterization

GUNAWAN PRIADI^{1,*}, FITRI SETIYONINGRUM¹, FIFI AFIATI¹

¹Pusat Penelitian Bioteknologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia Jalan Raya Bogor KM 46 Cibinong Bogor Jawa Barat 16911,
*email: gunawan.priadi@gmail.com

Manuskrip diterima: 23 Juni 2018. Revisi disetujui: 21 Juli 2018.

Abstrak. Priadi G, Setiyoningrum F, Afaiti F. 2018. Enzim β -galaktosidase dari *Leuconostoc mesenteroides* indigenus: ekstraksi, purifikasi parsial dan karakterisasi. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 4*: 184-189. Industri susu menggunakan β -galaktosidase pada pengembangan produk untuk penderita *lactose intolerance*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakterisasi enzim β -galaktosidase hasil pemurnian parsial dari *Leuconostoc mesenteroides* indigenus pada suhu dan pH berbeda. Pemurnian enzim menggunakan amonium sulfat 50%, dan 60%. Karakterisasi dilakukan pada suhu 30, 40, 50 dan 60 °C, serta pada pH 5,6 dan 7. Hasil penelitian menunjukkan β -galaktosidase hasil pemurnian dengan pengendapan amonium sulfat 50% memiliki aktivitas spesifik tertinggi. Kerja optimal β -galaktosidase dalam menghidrolisis *o*-NPG diperoleh pada suhu 30 °C dan pH 7. Konsentrasi amonium sulfat dan suhu berpengaruh terhadap aktivitas spesifik enzim β -galaktosidase dari *Leuconostoc mesenteroides*.

Kata kunci: β -galaktosidase, amonium sulfat, suhu, pH

Abstract. Priadi G, Setiyoningrum F, Afaiti F. 2018. β -Galactosidase enzyme from indigenous *Leuconostoc mesenteroides*: extraction, partial purification and characterization. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 4*: 184-189. Dairy industry uses β -galactosidase in product development for lactose intolerance. The aim of this study was to determine the characterization of β -galactosidase partially purified from indigenous *Leuconostoc mesenteroides* to temperature and pH. Purification of enzymes using ammonium sulfate with concentration 40%, 50%, and 60%. Characterization was carried out at 30, 40, 50 and 60 °C, as well as at pH 5, 6 and 7. The results showed that β -galactosidase with 50% ammonium sulfate precipitation had the highest specific activity. The optimal work of β -galactosidase in hydrolyzing *o*-NPG is obtained at temperature 30 °C and pH 7. Ammonium sulfate concentration and temperature influenced the specific activity of β -galactosidase enzyme from *Leuconostoc mesenteroides*.

Keywords: β -galactosidase, ammonium sulfate, temperature, pH

PENDAHULUAN

Enzim β -galaktosidase atau lebih dikenal sebagai laktase merupakan biokatalis untuk hidrolisis laktosa menjadi monosakarida glukosa dan galaktosa, dan reaksi transgalaktosilasi (Chanalia et al. 2018; Princely et al. 2013). Fungsi hidrolisis dalam industri makanan digunakan untuk menurunkan kandungan laktosa dalam susu, sedangkan reaksi transgalaktosilasi digunakan untuk mensintesis di, tri, atau lebih galakto-oligosakarida, selain itu dalam industri susu enzim β -galaktosidase juga digunakan untuk mencegah kristalisasi laktosa, meningkatkan kemanisan, dan meningkatkan kelarutan produk susu (Princely et al. 2013), serta mengurangi laktosa dalam whey hasil samping industri keju. Penurunan laktosa dalam susu bermanfaat untuk konsumen *lactose intolerance*, yaitu orang yang memiliki sedikit produksi β -galaktosidase dan atau aktivitasnya rendah. Defisiensi enzim β -galaktosidase menyebabkan banyaknya laktosa tak

terdigesti dan tak terserap yang menambah volume cairan dalam usus halus, masuk ke saluran usus besar mengakibatkan perbedaan tekanan osmotik, laktosa yang tak terserap dimetabolisme oleh mikroflora kolon menghasilkan asam lemak rantai pendek, karbon dioksida, hidrogen dan gas metana, dan menyebabkan satu atau lebih dari gejala seperti diare, sakit perut, perut kembung, kram dan mual (Shaukat et al. 2010). Konsumen dengan gejala tersebut mencapai 70% dari populasi dewasa dunia (Husain 2010; Chanalia et al. 2018). Selain dimasukkan dalam produk susu, β -galaktosidase juga dapat dikonsumsi dalam bentuk suplemen (Vasiljevic dan Jelen 2001). Sumber β -galaktosidase dapat berasal dari tanaman, hewan, dan mikroorganisme (Soares et al. 2001). Namun untuk aplikasi industri mikroorganisme menjadi sumber potensial yang dipertimbangkan (Natarajan et al. 2012).

Mikroorganisme yang telah digunakan secara luas sebagai sumber β -galaktosidase adalah yeast *Kluyveromyces lactis* (Lee et al. 2003; Klewicki 2007).

Penelitian tentang produksi dan potensi β -galaktosidase yang bersumber dari mikroorganisme diantaranya *Bifidobacterium adolentis* (Hinz et al. 2004); *Lactobacillus acidophilus* (Ngunyen et al. 2006; Ahmad et al. 2014); *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces fragilis*, *Sacharomyces marxianus*, *Sacharomyces fragilis* (Singh et al. 2009); *Streptococcus pneumonia* (Jeong et al. 2009); *Lactobacillus sp.* dari whey (Gheyancy et al. 2010); *Lactobacillus pentosus* (Maischberger et al. 2010); *Bacillus sp.* dari limbah susu (Natarajan et al. 2012); *Streptococcus thermophilus* (Princely et al. 2013); yeast sp dari whey (Dake dan Gupta 2015); *Pediococcus pentosaceus* ID-7 (Lee et al. 2017); *Lactobacillus farciminis* (Setiyoningrum et al. 2017); dan *Pediococcus acidilactici* (Chanalía et al. 2018)

Menurut Somkuti et al. (1998) bakteri asam laktat (BAL) menjadi fokus penelitian enzim karena 3 hal yaitu orang yang *lactose intolerance* tidak mengalami gejala kelainan saat mengkonsumsi produk susu fermentasi yang mengandung BAL; BAL umumnya dianggap aman (*Generally Recommended as Safe/GRAS*) sehingga enzim yang dihasilkan dapat digunakan tanpa purifikasi lebih lanjut (Valijevic dan Jelen 2001); beberapa strain BAL memiliki aktivitas probiotik seperti meningkatkan digesti laktosa dan strain terpilih telah digunakan dalam memproduksi produk susu probiotik (Vinderola dan Reinheimer 2003). Bakteri probiotik sangat signifikan untuk menghasilkan β -galaktosidase aktivitas tinggi (Chanalía et al. 2018). Pemilihan BAL untuk menghidrolisis laktosa dikarenakan kemudahan fermentasi, aktivitas enzim yang tinggi dan stabilitas yang baik (Picard et al. 2005).

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi enzim β -galaktosidase dari BAL yaitu bakteri indigenus *Leuconostoc mesenteroides*, menguji aktivitas spesifik enzim, mempelajari pengaruh amonium sulfat pada proses purifikasi parsial dan menentukan suhu serta pH optimum dari kerja enzim tersebut. Dengan diketahuinya potensi enzim β -galaktosidase dari *Leuconostoc mesenteroides*, diharapkan penambahan bakteri ini pada susu dan produk susu akan membantu mengurangi gejala *lactose intolerance* saat mengkonsuminya.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan alat

Bakteri *Leuconostoc mesenteroides* diperoleh dari *Indonesian Culture Collection (InaCC)*. Media pertumbuhan dan produksi enzim terdiri dari MRS (*de Mann Rogosa Sharpe*) ditambah 1% laktosa. Untuk tahapan purifikasi parsial dan pengujian kimia bahan yang digunakan adalah membran selulosa (11 kDa), media MRSB (*de Mann Rogosa Sharpe Broth*) (Merck, Germany), pure agar, laktosa (Fisher Scientific Company, USA), KH_2PO_4 (Merck, Germany), K_2HPO_4 (Merck, Germany), *coomassie brilliant blue* (Merck, Germany), asam fosfor 85% (Merck, Germany), amonium sulfat (Merck, Germany), *bovine serum albumin* (BSA) (Applichem, USA), etanol (Merck, Germany), *o*-nitrofenil-

β -D-galaktopiranosida (*oNPG*) (Thermo Fisher Scientific, USA), dan Na_2CO_3 (Merck, Germany).

Peralatan yang digunakan dalam penelitian adalah *laminar air flow* (Telstar BH-100, Spain), sonikator (Labsonic, Germany), spektrofotometer UV-Vis 1800 (Shimidzu, Japan), autoklaf (Raypa, Spain), inkubator (Thermo Fisher Scientific, USA), sentrifuse (Hitachi CR21G III, Japan), timbangan analitik (Shimidzu, Japan), magnetic stirrer (Raypa AG-5, Spain), penangas air, penangas es, dan alat-alat gelas lainnya.

Ekstraksi β -galaktosidase *Leuconostoc mesenteroides* (modifikasi Wang dan Sakakibara, 1997)

Ekstraksi enzim dilakukan dengan menginokulasikan 2% *Leuconostoc mesenteroides* ke dalam media produksi MRSB (yang ditambahkan 1% laktosa), kemudian diinkubasi pada 37 °C selama 24 jam. Selanjutnya dilakukan pemanenan sel dengan sentrifugasi 9000 rpm pada suhu 4 °C selama 30 menit. Pellet yang dihasilkan kemudian dicuci dengan buffer fosfat 0,1 M pH 7 sebanyak 2 kali. Sel (pellet) dipecah menggunakan sonikator dengan amplitudo 50, *cycle* 0,5 selama 5 menit dengan interval jeda setiap 1 menit. Proses pemecahan dioptimalkan pada suhu rendah. Setelah sel dipecah, dilakukan pemisahan menggunakan sentrifugasi 9000 rpm, suhu 4 °C selama 30 menit. Supernatan dipisahkan dari peletnya kemudian disimpan pada suhu dingin untuk kemudian dianalisis aktivitas enzim, kadar protein dan aktivitas spesifiknya. Supernatan yang diperoleh merupakan enzim kasar (*crude enzyme*).

Purifikasi parsial enzim kasar

Pengendapan protein dengan amonium sulfat (modifikasi Scopes, 1987)

Sebanyak 50 mL enzim kasar β -galaktosidase diendapkan dengan amonium sulfat sampai diperoleh konsentrasi amonium sulfat 50% dan 60%. Penambahan amonium sulfat dilakukan sedikit demi sedikit hingga semua larut, pada suhu dingin (ruangan berpendingin 4-6 °C) dan pengadukan kecepatan rendah. Kemudian larutan didiamkan selama 1 malam pada suhu dingin. Selanjutnya larutan enzim disentrifugasi dengan kecepatan 9000 rpm, suhu 4°C selama 30 menit. Supernatan yang dihasilkan dipisahkan dari pelletnya. Pellet yang telah terpisah dicuci dengan buffer fosfat 0,1 M pH 7. Konsentrasi protein dan aktivitas enzim β -galaktosidase hasil pengendapan dianalisis kembali. Jumlah amonium sulfat yang digunakan untuk mengendapkan enzim dihitung dengan persamaan:

$$\text{Jumlah amonium sulfat (g/L)} = \frac{533(S_2 - S_1)}{100 - 0,3 S_2} \quad (1)$$

S_1 = konsentrai awal amonium sulfat
 S_2 = konsentrasi akhir amonium sulfat yang diinginkan

533 = jumlah garam amonium sulfat yang dibutuhkan perliter larutan untuk membuat larutan jenuh 100%

Dialisis (modifikasi Pal et al. 2013)

Enzim β -galaktosidase hasil pengendapan didialisis menggunakan membran selulosa 11 kDa. Enzim dimasukkan kedalam membran kemudian direndam dalam 750 mL buffer fosfat 0,025 M pH 7 dengan pengadukan rendah pada suhu dingin (4-6 °C). Setiap 8 jam dilakukan penggantian larutan buffer (3 kali penggantian). Konsentrasi protein dan aktivitas enzim β -galaktosidase hasil pengendapan dianalisis kembali. Enzim β -galaktosidase hasil dialisis disimpan pada suhu dingin.

Penentuan kadar protein (Bradford, 1976)

Larutan enzim 100 μ L ditambahkan 1 mL pereaksi Bradford, di vortek dan diinkubasi selama 5 menit, lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 595 nm. Kurva standar protein menggunakan *bovine serum albumin* (BSA) dengan berbagai konsentrasi.

Uji aktivitas β -galaktosidase (modifikasi Marteu et al. 1990)

Uji aktivitas dilakukan dengan memasukkan 1000 μ L dan 100 μ L enzim dalam tabung reaksi, lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 15 menit. Kemudian ditambahkan 200 mL *o*NPG 2 mg/L dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 15 menit. Setelah inkubasi kedua selesai, ditambahkan 1000 μ L Na_2CO_3 1 M untuk menghentikan reaksi. Kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 420 nm. Aktivitas enzim (U/mL) adalah jumlah μ mol *o*-nitrofenol (*o*NP) yang dibentuk per menit per milliliter enzim pada kondisi percobaan (37 °C) (Al-Arriji et al. 2017). Aktivitas enzim dihitung dengan persamaan:

$$\text{Aktivitas enzim (U/ml)} = \frac{\text{mikromol } o\text{NP}}{V \times t} \quad (2)$$

$$\text{Aktivitas spesifik (U/mg protein)} = \frac{\text{aktivitas enzim}}{\text{kadar protein}} \quad (3)$$

Mikromol *o*NP = jumlah *o*NP saat percobaan
 V = volume enzim yang diuji (100 μ L)
 t = waktu inkubasi (menit)

Karakterisasi enzim β -galaktosidase

Uji aktivitas enzim pada berbagai suhu

Sebanyak 100 μ L enzim hasil purifikasi (dengan pengendapan amonium sulfat 50% dan 60%) dimasukkan kedalam 1 mL buffer fosfat 0,1 M, kemudian diinkubasi selama 5 menit pada suhu 30, 40, 50, dan 60 °C. Selanjutnya diuji aktivitas enzimnya sesuai suhu perlakuan.

Uji aktivitas enzim pada berbagai pH

Sebanyak 100 μ L enzim hasil purifikasi (dengan pengendapan amonium sulfat 50% dan 60%) dimasukkan kedalam 1 mL buffer fosfat 0,1 M, kemudian diinkubasi selama 5 menit pada pH 5,6 dan 7. Selanjutnya diuji aktivitas enzimnya sesuai pH perlakuan.

Analisis data

Data karakterisasi enzim diolah dengan SPSS 22 untuk dianalisis keragamannya (ANOVA), jika terdapat perbedaan pengaruh yang signifikan ($p < 0,05$) pada variabel bebas maka dilanjutkan uji perbedaan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi dan purifikasi parsial enzim β -galaktosidase

Leuconostoc mesenteroides yang digunakan merupakan bakteri yang diisolasi dari tape singkong asal Yogyakarta. Seperti golongan *Leuconostoc* lainnya bakteri ini banyak ditemukan pada buah dan sayuran, bertanggung jawab pada proses pembuatan asinan dan fermentasi sayuran lainnya. Bakteri ini juga digunakan pada fermentasi susu dan roti (Busson et al. 1999). β -galaktosidase adalah enzim intraseluler (Princely et al. 2013). Isolasi dan produksi enzim β -galaktosidase diawali dengan menumbuhkan bakteri pada media selektif yang diperkaya laktosa. Menurut Gheyanchy et al. (2010) penambahan 1% laktosa dapat meningkatkan aktivitas enzim β -galaktosidase. Inkubasi pada suhu 37 °C akan memberikan produksi β -galaktosidase maksimum (Chakraborti et al. 2003). Sonikasi merupakan salah satu cara ekstraksi enzim dari bakteri dengan memecah sel. Gelombang suara tekanan tinggi akan menyebabkan gangguan dan merusak dinding sel.

Enzim diendapkan dengan garam amonium sulfat. Pengendapan garam bivalen seperti magnesium klorida, magnesium sulfat, dan amonium sulfat lebih efektif dibandingkan dibandingkan garam monovalen seperti sodium klorida, amonium klorida, dan kalium klorida (Boyer 2002). Pemilihan amonium sulfat pada proses pengendapan juga dikarenakan kelarutan yang tinggi, harga murah, dan umumnya pada konsentrasi tertentu tidak mempengaruhi struktur protein (Beynon dan Bond 2001). Prinsip pengendapan enzim oleh amonium sulfat mengikuti fenomena *salting out*. Amonium sulfat memiliki kemampuan untuk menetralkan muatan pada permukaan protein dan mengganggu kelaitan air di sekitar protein, hal ini akan menyebabkan penurunan kelarutan protein dan akhirnya menyebabkan protein mengendap (Scopes, 1993; Duong-Ly dan Gabelli 2014; Fatchiyah et al. 2011).

Proses dialisis bertujuan untuk mengeluarkan garam amonium sulfat dan molekul pengotor lain yang dapat mempengaruhi kestabilan enzim. Saat dialisis terjadi proses difusi dan osmosis yang ditandai dengan masuknya larutan buffer kedalam kantung dialisis menggantikan garam dan pengotor yang keluar. Membran dialisis dipilih sesuai dengan ukuran berat molekul dari enzim. Perbedaan berat molekul pada enzim didasarkan pada sumber enzim, metode ekstraksi, ketepatan purifikasi, dan tipe dari enzim seperti ekstra atau intraseluler, beberapa pustaka mengindikasikan sifat genetik dan kondisi lingkungan enzim dapat mempengaruhi berat molekul enzim (Abdullah et al. 2014). Aktivitas dan aktivitas spesifik enzim β -galaktosidase dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Aktivitas enzim β -galaktosidase *Leuconostoc mesenteroides* hasil purifikasi parsial dengan ammonium sulfat

Konsentrasi amonium sulfat	Aktivitas enzim (U/mL)	Aktivitas spesifik (U/mg protein)
50%	6,77	11,04
60%	3,28	5,84

Tabel 1 menunjukkan enzim β -galaktosidase dengan pengendapan amonium sulfat 50% memiliki nilai aktivitas enzim yang lebih tinggi dibandingkan amonium sulfat 60%. Aktivitas enzim dipengaruhi oleh terbentuknya kompleks enzim dan substrat, dimungkinkan pada hasil pengendapan dengan ammonium sulfat 60% terjadi gangguan terhadap terbentuknya kompleks enzim substrat karena tersisanya garam atau pengotor yang tidak hilang saat dialisis. Hasil berbeda dilaporkan pada penelitian Ahmad et al. (2014) dan Al Arrji et al. (2017). Pengendapan enzim β -galaktosidase dengan amonium sulfat 60-80%, memberikan nilai aktivitas enzim terbesar pada pengendapan dengan amonium sulfat 80% (Ahmad et al. 2014), sedangkan pada Al Arrji et al. (2017), pengendapan menggunakan ammonium sulfat 20-60% memberikan nilai aktivitas enzim terbesar pada amonium sulfat 60%.

Aktivitas enzim dan aktivitas spesifik enzim β -galaktosidase yang dihasilkan pada pengendapan amonium sulfat 50% adalah 6,77 U/mL dan 11,04 U/mg. Hasil tersebut lebih kecil jika dibandingkan dengan *Kluyveromyces marxianus* 177 U/mL, *Kluyveromyces fragilis* 170 U/mL, *Sacharomyces marxianus* 175 U/mL, *Sacharomyces fragilis* 155 U/mL (Singh et al. 2009); *Lactobacillus pentosus* 304 U/mg (Maischberger et al. 2010); *Streptococcus thermophilus* 119,38 U/mg (Princely et al. 2013); *Pediococcus pentosaceus* ID-7 (LacL) 31 U/mg (Lee et al. 2017); *Lactobacillus farciminis* 19,65 U/mg (Setiyoningrum et al. 2017). Namun hasil aktivitas tersebut masih lebih baik dibandingkan dengan *Lactobacillus sp.* 1,966 U/mL (Gheytancy et al. 2010); *Bacillus sp.* 3,307 U/mg (Natarajan et al. 2012); *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 0,671 U/mL, *Lactobacillus reuteri* ATCC 23271 0,420 U/mL dan *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009 0,344 U/mL (Carevic et al. 2014). Perbedaan aktivitas enzim β -galaktosidase dari penelitian-penelitian tersebut dikarenakan perbedaan mikroorganisme penghasil enzim, metode ekstraksi, metode pengendapan, dan metode purifikasi yang dilakukan. Purifikasi tingkat lanjut akan meningkatkan aktivitas enzim. Aktivitas enzim meningkat 1,13 kali lipat dari enzim kasar dengan penggunaan *gel filtration Sephadex G-100* dibandingkan amonium sulfat 1,06 kali lipat (Princely et al. 2013). Penggunaan *Sephadex G-200* pada purifikasi meningkatkan 6,92 kali lipat aktivitas enzim dibandingkan amonium sulfat 4,74 kali lipat dari enzim kasar (Ahmad et al. 2014)

Karakterisasi enzim pada kondisi suhu dan pH berbeda

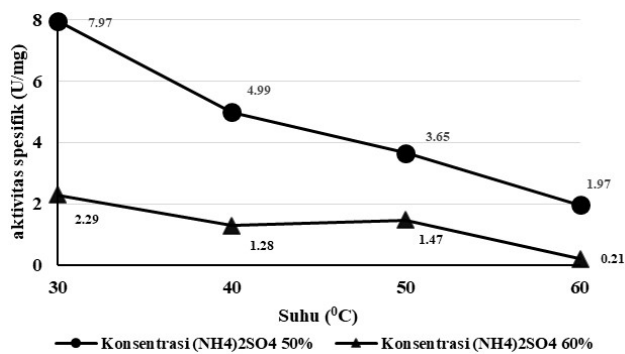
Aktivitas enzim dipengaruhi suhu, pH, konsentrasi substrat, konsentrasi enzim dan adanya aktivator atau inhibitor. Suhu mempengaruhi laju reaksi katalisis enzim dengan 2 cara yaitu (i) kenaikan suhu akan meningkatkan energi molekul substrat dan pada akhirnya meningkatkan laju reaksi enzim. Peningkatan suhu juga berpengaruh terhadap perubahan konformasi substrat sehingga sisi aktif substrat mengalami hambatan untuk memasuki sisi aktif enzim dan menyebabkan turunnya aktivitas enzim, dan (ii) peningkatan energi termal molekul akan menyebabkan rusaknya interaksi non kovalen yang

menjaga struktur 3 dimensi enzim secara bersama sama sehingga enzim mengalami denaturasi. Denaturasi menyebabkan struktur lipatan enzim membuka pada bagian permukaannya sehingga sisi aktif enzim berubah dan terjadi penurunan aktivitas enzim (Hames dan Hoper 2000). Gambar I menunjukkan hasil pengujian aktivitas spesifik enzim pada beberapa suhu.

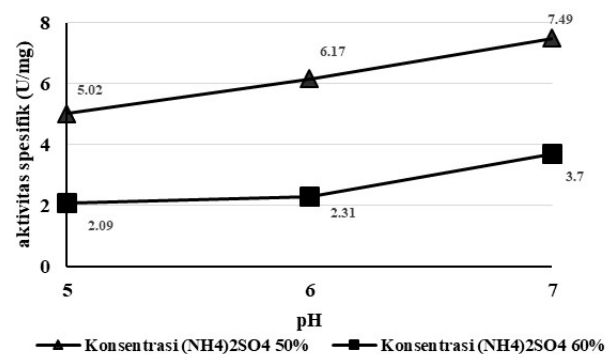
Dari Gambar 1 terlihat penurunan aktivitas enzim dengan bertambahnya suhu. Aktivitas enzim pada suhu 60 °C sangat rendah dibandingkan suhu lainnya, karena pada suhu tersebut dimungkinkan telah terjadi kerusakan enzim. Penelitian Arrji et al. (2017) melaporkan aktivitas β -galaktosidase menurun karena denaturasi dari enzim sebagai akibat dari energi panas yang merusak ikatan dalam enzim, merubah konfigurasi sisi aktif dan melemahkan terjadinya kompleks enzim substrat. Aktivitas enzim terbesar terjadi pada suhu 30°C baik pada pengendapan dengan amonium sulfat 50% maupun 60%. Menurut penelitian Dake dan Gupta (2012) optimum produksi enzim terjadi pada suhu 37-45 °C, sedangkan Chanalia et al., (2018) melaporkan aktivitas enzim akan meningkat sampai 50 °C dan menurun pada 55 °C. Konsentrasi amonium sulfat dan suhu berpengaruh terhadap aktivitas spesifik enzim β -galaktosidase dari *Leuconostoc mesenteroides* ($p < 0,05$). Pada penelitian lain, suhu optimal berada di rentang 40 sampai 50 °C seperti pada Princely et al. (2013); Lee et al. (2017); dan Arrji et al. (2017).

Pengaruh pH pada enzim berkaitan dengan keadaan ionisasi dari sistem yang dikatalisis, termasuk substrat, dan enzim itu sendiri. Perubahan pH dapat mempengaruhi ionisasi asam-asam amino pada sisi aktif enzim sehingga berpengaruh pada interaksi dengan molekul substrat. Kondisi pH yang terlalu rendah atau tinggi akan menyebabkan ketidakstabilan pada konformasi enzim sehingga menyebabkan struktur enzim menjadi rusak (Lehninger 2004; Dake dan Gupta 2015). Enzim mempunyai pH optimum untuk menghasilkan aktivitas yang maksimal. Hasil pengujian aktivitas enzim pada beberapa pH dapat dilihat pada Gambar 2.

Aktivitas enzim meningkat dengan semakin besarnya pH. Pada pH 7 aktivitas enzim lebih besar dibandingkan pH 6 dan 5, baik pada pengendapan dengan amonium sulfat 50% ataupun 60%. Enzim memiliki aktivitas yang rendah pada pH dibawah 3 dan tidak menunjukkan aktivitasnya pada pH 8 (Abdullah et al. 2014). Penurunan aktivitas β -galaktosidase disebabkan protonisasi dan deprotonisasi dari grup ion katalik yang ada pada sisi aktif dari enzim, kompleks enzim substrat (ES) dan kompleks enzim produk (EP) (Meera et al. 2013; Rahman et al. 2015). Hasil penelitian yang sama dilaporkan oleh Meishberger et al. (2010); Natarajan et al. (2012); Princely et al. (2013); Arrji et al. (2017); Lee et al. (2017); dan Setiyoningrum et al. (2017). Hasil berbeda pada penelitian Dake dan Gupta (2012); Sigh et al. (2014) dan Chanalia et al. (2018) yaitu pH optimum aktivitas enzim pada pH 6, sedangkan Arrji et al. (2017) melaporkan pH 5 sebagai pH optimum aktivitas enzim. Kenaikan pH tidak memberikan pengaruh signifikan terhadap aktivitas enzim ($p > 0,05$).



Gambar 1. Pengaruh suhu inkubasi 30, 40, 50 dan 60 °C terhadap aktivitas enzim β-galaktosidase dari *Leuconostoc mesenteroides*



Gambar 2. Pengaruh pH 5, 6 dan 7 terhadap aktivitas enzim β-galaktosidase dari *Leuconostoc mesenteroides*

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan proses isolasi, purifikasi parsial dan karakterisasi enzim β-galaktosidase dari *Leuconostoc mesenteroides* optimum untuk menghasilkan aktivitas enzim yang tinggi jika dilakukan dengan kondisi pengendapan menggunakan amonium sulfat 50%, suhu 30°C dan pH 7 dengan aktivitas spesifik tertinggi 11,04 U/mg protein. Konsentrasi amonium sulfat dan suhu berpengaruh signifikan terhadap aktivitas enzim.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini memperoleh dana dari Program Unggulan IPH LIPI Biovillage. Tim penulis mengucapkan terima kasih kepada staf peneliti Laboratorium Reproduksi dan Kultur Sel Hewan Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI, Dr. Puspita Lisdiyanti, M.Agr. Chem., Rohmatussolihat M.Si dan Nurhayati (mahasiswa Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Muhammadiyah Sukabumi) atas terselenggara dan selesainya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah Q, Al-Jibori M, Al-Arriji S. 2014. Extraction purification and characterization of lipoxygenase from *Pleurotus ostreatus*. *Iraqi J Sci* 55 (1): 61-69.
- Ahmad R, Jebor MA, Abdulla A, Mahdi RK. 2014. Extraction and purification of β-galactosidase from a local isolate of *Lactobacillus acidophilus*. *Intl J Med Pharmaceut Sci* 4 (4): 47-54.
- Al-Arriji SB, Al-Hamadi NA. 2017. Extraction, purification and characterization β-galactosidase from apricot (*Prunus armeniaca* kaisa) fruit for lactose intolerance treatment. *Intl J ChemTech Res* 10 (6): 919-929.
- Beynon R, Bond JS. 2001. *Proteolytic enzyme: a practical approach*, 2nd ed. Oxford University Press, Oxford.
- Boyer R. 2002. *Concept in Biochemistry*. Brook Cole: United States.
- Busson CS, Foucaud C, Leveau J Y. 1999. Selection of dairy *Leuconostoc* isolates for important technological properties. *J Dairy Res* 66: 245-256.
- Chanalia P, Gandhi D, Attri P, Dhanda S. 2018. Purification and characterization of β-galactosidase from probiotik *Pediococcus acidilactici* and its use in milk lactose hydrolysis and galactooligosaccharide synthetys. *Bioorg Chem* 77: 176-189.
- Chakraborti S, Sani RK, Sahoo DK, Benerjee UC, Sobti RC. 2003. Production and partial characterization of a novel beta galactosidase from newly isolated *Bacillus polymyxa*. *Scientia Iranica* 10: 279-286.
- Dake SM, Gupta K. 2012. Isolation of β-galactosidase from a *Yeast* sp. isolated from whey. *Intl J Adv Biotechnol Res* 6 (3): 425-432.
- Duong-Ly KC, Gabelli SB. 2014. Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation. *Methods in Enzymology* 541: 85-94.
- Fatchiyah, Arumingtyas EL, Widarti S, Rahayu S. 2011. *Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analisis*. Erlangga, Jakarta.
- Gheytanchy E, Heshmati F, Shargh BK, Nowroozi J, Movahedzadeh F. 2010. Study on β-galactosidase enzyme produced by isolate *Lactobacilli* from milk and cheese. *African J Microbiol Res* 4 (6): 454-458.
- Hames BD, Hoper NM. 2000. *Biochemistry: The Instant Notes*. ed 2. Springer-Verlag, Hongkong.
- Hinz SWA, van den Broek LAM, Beldman G, Vincken JP, Voragen AGJ. 2004. β-galactosidase from *Bifidobacterium adolentis* DSM290083 prefers β (1,4)-galactosides over lactose. *Appl Microbiol Biotechnol* 66: 276-284.
- Husain Q. 2010. Beta galactosidase and their potential application: a review. *Crit Rev Biotechnol* 30: 41-62.
- Jeong JK, Kwon OS, Lee YM, Oh DB, Lee JM, Kim SH, Kim EH, Lee TN, Rhee KD, Kang HA. 2009. Characterization of the *Streptococcus pneumoniae* BgaC protein as a novel surface β-galactosidase with specific hydrolysis activity for the Gal β1-3GlcNAc moiety of oligosaccharides. *J Bacteriol* 191: 3011-3023.
- Klewicki R. 2007. Formation of gal-sorbitol during lactose hydrolysis with β galactosidase. *Food Chem* 100: 1196-1201.
- Lee DH, Kang SG, Suh SG, Byun JK. 2003. Purification and characterization of a beta-galactosidase from peach (*Prunus persica*). *Mol Cells* 15: 68-74.
- Lee JY, Kwak MS, Roh JB, Kim K, Sung MH. 2017. Microbial β-galactosidase of *Pediococcus pentosaceus* ID-7: isolation, cloning, and molekular characterization. *J Microbiol Biotechnol* 27 (3): 598-609.
- Lehninger A L. 2004 *Principles of Biochemistry*. Elsevier Science, Amhrest.
- Maischberger T, Leitner E, Nitisinprasert S, Juajun O, Yamabhai M, Nguyen TH, Haltrich D. β-galactosidase from *Lactobacillus pentosus*: purification, characterization and formation of galactooligosaccharides. *Biotechnol J* 5: 838-847.
- Meera N, Theja P, Devi M. 2013. Production and optimization of β-galactosidase enzyme using probiotic *Yeast* spp. *Ann Biol Res* 4 (12): 62-67.
- Natarajan JC, Christobell DJ, Kumar M. 2012. Isolation and characterization of β-galactosidase producing *Bacillus* sp. from dairy effluent. *World Appl Sci J* 17 (11): 1466-1474.

- Nguyen TH, Splechtina B, Steinbock M, Kneifel W, Lettner HP, Kulbe KD, Haltrich D. 2006. Purification and characterization of two novel β -galactosidase from *Lactobacillus reuteri*. *J Agric Food Chem* 54:4989-4998.
- Picard C, Fioramonti J, Francois A, Robinson T, Neant F, Matuchansky C. 2005. Review article: Bifidobacteria as probiotic agent- physiological effects and clinical benefits. *Aliment Pharmacol Therapeut* 22: 495-512.
- Princely S, Basha NS, Kirubaran JJ, Dhanaraju MD. 2013. Biochemical characterization, partial purification, and production of an intracellular beta-galactosidase from *Streptococcus thermophilus* grown in whey. *Pelagia Research Library* 3 (2): 242-251.
- Rahman MZ, Maeda M, Kimura Y. 2015. β -galactosidase from *Ginkgo biloba* seeds active against β -galactosidase-containjng N-glicans: purification and characterization. *Biosci Biotechnol Biochem* 79 (9): 1464-1472.
- Setiyoningrum F, Priadi G, Afiati F. 2017. Purifikasi Parsial dan Karakterisasi Enzim β -Galaktosidase Isolasi dari Bakteri Asam Laktat (BAL) Indigenus *Lactobacillus farciminis*. *Prosiding Seminar Nasional Peternakan Berkelanjutan Nasional 9*. Universitas Padjadjaran, Sumedang 15 November 2017.
- Sharma S, Sigh P. 2014. Isolation and characterization of β -galactosidase enzyme producing microbe and optimization of its enzyme activity under different culture condition. *Intl J Curr Microbiol Appl Sci* 3 (7): 148-155.
- Shaukat A, Levitt MD, Taylor BC, Mac Donald R, Shamliyan TA, Kane RL, Wilt TJ. 2010. Systematic review: Effective management strategies for lactose intolerance. *Ann Internal Med* 152 (12): 797-803.
- Singh AK, Sinha S, Singh K. 2009. Study on β -galactosidase isolation, purification and optimization of lactose hydrolysis in whey for production of instant energy drink. *Intl J Food Eng* 5 (2) art 5:1-10.
- Soares I, Tavora Z, Barcelos RP, Baroni S. 2001. Microorganism produced enzyme in food industry. *J Agric Biol Sci* 488: 83-84.
- Somkuti GA, Dominiecki ME, Steynberg DH. 1998. Permeabilization of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus dekrueckii* subsp. *bulgaricus* with ethanol. *Current Microbiology* 36: 202-206.
- Vasiljevic T, Jelen P. 2001. Production of β -galactosidase for lactose hydrolysis in milk and products using thermophilic lactic acid bacteria. *J Innov Food Sci Emerg Technol* 2: 75-85.
- Vinderola CG, Reinheimer JA. 2003. Lactic acid starter and probiotic bacteria, a comparative "in vitro" study of probiotic characteristic and biological barriers resistance. *J Food Res Intl* 36: 895-904.