

LACTASE IMMOBILIZATION WITH ENTRAPMENT METHOD USING CALCIUM ALGINATE MATRIX FOR LACTOSE HYDROLYSIS APPLIANCE

Maria Goretti Marianti Purwanto*, Wersha, Ruth Chrisnasari

*Fakultas Teknobiologi, Universitas Surabaya,

E-mail: maria_gmp@staff.ubaya.ac.id

Abstract

People with lactose intolerance are limited to consume milk and milk derived products. Therefore, it is important to develop lactose hydrolysis system by lactase. The focus of this research is to find the best method to stabilize the enzyme and to design a household appliance which can be applied for lactose hydrolysis. Technically it is very difficult to separate the enzyme from their products and get back the active enzyme at the end of the reaction, so the enzyme immobilization is conducted. Lactase immobilization on alginate performed by entrapment method. The study was conducted to determine the best alginate concentration for immobilization and to design a simple appliance for lactose hydrolysis. The best alginate concentration was found to be 2% (w/v) giving immobilization efficiency of $98.31 \pm 0.29\%$. Time required to reduce lactose concentration to $\pm 1\%$ b/v based on the design of tools made with 90 mg enzymes and 150 ml substrate was 5 hours. Free lactase activity was 0.049 ± 0.001 mol/min and immobilized lactase activity was 0.004 ± 0.0004 mol/min. The K_m values of the immobilized lactase was 17.18% and the V_{max} value was 0.246% / min. K_m values of the free lactase was 3.45% and the V_{max} value was 0.292%/min. The activity of the immobilized lactase was decreased in the second cycle by 12% of the initial value.

Keywords: Lactase, Alginate, Immobilization

PENDAHULUAN

Laktosa lebih dikenal dengan nama gula susu karena laktosa paling banyak ditemukan dalam susu dan merupakan satu-satunya gula yang ada pada susu (Sinuhaji, 2006). Laktosa merupakan gula disakarida yang dibentuk dari dua monosakarida yaitu glukosa dan galaktosa dengan bantuan enzim lactase synthetase. Laktosa dapat diserap oleh sel-sel tubuh manusia apabila telah dihidrolisis menjadi glukosa dan galaktosa. Laktosa dapat dihidrolisis menjadi monomernya melalui bantuan enzim. Enzim yang berfungsi untuk menghidrolisis laktosa menjadi glukosa dan galaktosa adalah enzim laktase. Banyak orang di dunia tidak dapat mengonsumsi susu atau produk lain yang mengandung laktosa karena tidak toleran terhadap laktosa (lactose intolerance). Terdapat sekitar 75% dari populasi dunia yang tidak toleran terhadap laktosa yang sebagian besar adalah orang-orang Asia, Amerika Selatan dan Afrika (Roy, 2011). Konsumsi laktosa bagi konsumen lactose intolerance dapat dilakukan dengan memecah

terlebih dahulu laktosa yang ada dalam produk seperti susu dengan menggunakan enzim laktase. Selain berguna bagi para konsumen yang lactose intolerance, laktosa yang telah dipecah dalam susu juga dapat menyebabkan rasa susu yang lebih manis. Penggunaan enzim di industri dalam bentuk bebas telah banyak dilakukan, namun untuk setiap proses baru harus digunakan enzim baru (sebab dalam keadaan bebas, enzim sulit dipisahkan dari sistem). Proses imobilisasi enzim dapat menjadi suatu solusi untuk mengurangi biaya dan harga produksi. Dengan adanya imobilisasi enzim maka satu enzim dapat digunakan berulang kali karena menjadi mudah untuk dipisahkan. Imobilisasi enzim merupakan metode yang membatasi pergerakan molekul enzim secara fisik dalam ruang reaksi yang dikatalisisnya. Imobilisasi enzim ini juga banyak dilakukan karena dapat meningkatkan kestabilan dari enzim (Sengupta-Dasgupta, 2006). Imobilisasi dapat menjaga kestabilan struktur enzim dalam aplikasinya bahkan dalam kondisi pH, temperatur dan pelarut organik yang ekstrim

dimana enzim tanpa imobilisasi tidak dapat bertahan pada kondisi tersebut (Sengupta-Dasgupta, 2006). Teknologi imobilisasi juga dapat mengurangi terjadinya feed back inhibition dari produk yang dihasilkan sehingga dapat menghasilkan produk dalam jumlah lebih besar. Pada metode entrapment, enzim dijebak dalam suatu matriks dan dibuat dalam bentuk beads. Metode entrapment dilakukan dengan menggunakan matriks kalsium alginat yang diketahui aman untuk mengimobilkan enzim untuk penggunaan pada bahan makanan. Alginat merupakan polimer dari asam β -manuronat dan asam α -L-glukoronat. Alginat merupakan polisakarida yang dibentuk dari algae. Alginat dapat menjadi bentuk gel jika bertemu dengan ion kalsium (Sengupta-Dasgupta, 2006).

Pada penelitian ini, akan dirancang suatu alat yang mengandung enzim laktase terimobil dengan metode entrapment dengan kalsium alginat yang nantinya dapat diterapkan untuk mereduksi kadar laktosa di dalam susu. Salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan proses imobilisasi adalah konsentrasi alginat yang digunakan. Selain itu, perlu diteliti waktu yang diperlukan untuk mereduksi laktosa sampai kadar yang dapat ditoleransi yaitu sampai $\pm 1\%$ (b/v).

METODE PENELITIAN

Bahan

Substrat yang digunakan dalam penelitian ini adalah laktosa murni Pro Analysis (PA). Enzim yang digunakan adalah enzim laktase yang diisolasi dari *Aspergillus oryzae* (PA Biomedicals) dengan aktivitas >5000 unit/gram. Bahan kimia yang digunakan yaitu asam alginat, CaCl_2 , buffer asetat 0,2M pH 4,8, aquades, aquabides, *acetonitrile*. Semua bahan yang digunakan adalah Pro Analysis (PA).

Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah peralatan gelas, vortex Maxi Mix II Type 37600 Mixer, sonikator Branson 1510, waterbath Thermostat HH4, pH meter Eutech Instrument pH 510 Cyberson, aluminium foil, mikro pipet, tabung mikro Eppendorf ukuran 1,5 ml, kuvet Plastibrand, spektrofotometer Uvikon 922, magnetic stirer Labtech Merk,

magnetic bar, pompa peristaltik Cole Parmer model No. 7553-75 6-600 rpm dan pengatur kecepatan Cole Parmer Masterflex, kolom dan peralatan HPLC Agilent Technologies.

Variabel dan Parameter Penelitian

Penelitian dilakukan dengan tiga kali pengulangan dan parameter pengukuran pada penelitian ini adalah pengurangan nilai kadar laktosa dalam sampel yang diukur dengan metode HPLC menggunakan detektor RI dan efisiensi imobilisasi yang dilakukan dengan metode spektrofotometri UV pada panjang gelombang 280nm. Variabel penelitian adalah konsentrasi matriks alginat 2%, 3% dan 4% (b/v) dan waktu yang diperlukan enzim terimobil untuk mereduksi kadar laktosa dalam sampel menjadi $\pm 1\%$ (b/v). Pada penelitian ini juga dilakukan penentuan nilai K_m dan V_{max} serta berapa kali pemakaian dari enzim laktase terimobilisasi dan aktivitasnya pada n pemakaian tersebut.

Prosedur Kerja

Imobilisasi Laktase dengan Metode Entrapment

Imobilisasi enzim laktase dengan entrapment dimulai dengan membuat larutan asam alginat dengan variasi konsentrasi 2%, 3% dan 4% (b/v) kemudian mencampurkan 5 ml asam alginat dengan 5 ml larutan enzim (konsentrasi 6mg/ml). Campuran larutan alginat dan enzim dihomogenkan kemudian menggunakan alat pompa peristaltik, campuran tersebut diteteskan ke dalam 50 ml larutan CaCl_2 0,1 M dingin sambil diaduk menggunakan stirer. Penetesan campuran ke dalam CaCl_2 akan menyebabkan terbentuknya *beads* (granul). Penetesan dilakukan sampai semua campuran enzim-alginat habis. *Beads* yang terbentuk dicuci beberapa kali dengan menggunakan aquades kemudian direndam dalam buffer asetat 0,2 M pH 4,8 selama 30 menit.

Penentuan Konsentrasi Alginat Terbaik

Penentuan konsentrasi alginat terbaik dilakukan dengan melewati larutan laktosa murni 4% (b/v) ke dalam kolom yang berisi enzim laktase terimobil sehingga terbentuk siklus berulang. Pengujian dilakukan hingga waktu tertentu. Pemilihan konsentrasi alginat

optimum dilakukan dengan melihat hasil konsentrasi laktosa sisa dari sampel dan efisiensi imobilisasi. Konsentrasi laktosa sisa dari dalam sampel dilihat dengan menggunakan metode HPLC dengan detektor RI dan efisiensi imobilisasi dilihat dari adanya enzim yang terlepas dari matriks (*leaching*) dengan menggunakan spektrofotometri UV pada panjang gelombang 280nm.

Uji Aktivitas Enzim Bebas

Enzim bebas diujikan pada substrat laktosa 4% untuk melihat aktivitas enzim bebas jika dibandingkan dengan enzim terimobil. Kondisi perlakuan pada enzim bebas disetarakan dengan enzim terimobil. Substat diinkubasi dalam enzim selama waktu tertentu kemudian diukur kadar laktosa yang tersisa dalam substrat dengan menggunakan HPLC detektor RI. Aktivitas dari enzim bebas kemudian dibandingkan dengan enzim terimobil. Aktivitas enzim dihitung dengan rumus :

$$\text{Aktivitas} = \frac{\text{mol laktosa yang dikonversi}}{\text{waktu inkubasi}}$$

Sumber: *Christhie, 2011*

Pengukuran K_m dan V_{max} Enzim Terimobil dan Enzim Bebas

Penentuan K_m dan V_{max} dilakukan seperti pengujian konsentrasi alginat optimum, namun dengan menggunakan variasi konsentrasi substrat laktosa yaitu 1%, 2%, 3% dan 4% (b/v). Konsentrasi laktosa sisa diukur dengan menggunakan HPLC.

Pembuatan Rancangan Alat Sederhana

Rancangan alat sederhana yang akan dibuat menggunakan alat-alat seperti erlenmeyer, kolom dan pompa peristaltik. Pompa peristaltik yang digunakan adalah pompa wiper mobil yang dihubungkan dengan adaptor. Pompa akan menarik larutan dalam erlenmeyer dan menyebabkan larutan laktosa akan naik ke dalam selang yang akan menuju ke kolom. Saat masuk ke dalam kolom yang berisi enzim terimobil larutan laktosa akan berinteraksi dengan beads enzim terimobil dan laktosa akan terhidrolisis. Larutan dari dalam kolom akan kembali ke dalam erlenmeyer dan terjadi siklus

berulang hidrolisis laktosa. Siklus dilakukan berulang-ulang pada jangka waktu tertentu.

Uji Kestabilan Enzim Terimobil

Kestabilan dari enzim laktase terimobil diuji dengan menggunakan enzim laktase terimobil secara berulang. Kestabilan dari enzim dapat diketahui dari aktivitas enzim laktase. Apabila setelah penggunaan berulang enzim laktase terimobil memiliki aktivitas yang hampir sama maka dapat dikatakan enzim terimobil stabil. Penurunan aktivitas enzim dihitung dengan rumus :

$$\% \text{penurunan aktivitas} = \frac{(\text{aktivitas pertama} - \text{aktivitas pemakaian ke-n}) \times 100\%}{\text{aktivitas pertama}}$$

Sumber: *Christhie, 2011*

Metode Pengukuran Kadar Laktosa

Kadar laktosa yang terkandung dalam sampel dideteksi dengan menggunakan metode HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Sistem HPLC terdiri atas pompa, injektor, kolom untuk analisa karbohidrat Zorbax Carbohydrat Analysis Column 4,6 x 250mm, 5 μ m, guard kolom dan detektor RI (refractive index). Eluent yang digunakan adalah acetonitrile dan air dengan perbandingan 75 : 25. Laju alir yang digunakan adalah 2ml/menit dan tekanan yang digunakan \pm 111 BAR. Volume injeksi adalah 30 μ l. Pada hasil kromatogram sinyal laktosa nampak pada sekitar menit ke-6.

Metode Pengukuran Kadar Protein

Penentuan kadar protein dilakukan dengan menggunakan metode spektrofotometri UV pada panjang gelombang 280nm. Pengukuran kadar protein dilakukan untuk mengukur kadar enzim yang tidak terimobil sehingga dapat diketahui efisiensi imobilisasi dalam bentuk persentase imobilisasi.

Analisa Data

Analisa data dalam penelitian ini akan menggunakan metode statistik Analysis of Variance (ANOVA). two ways tanpa interaksi yang digunakan untuk menganalisa data dengan berbagai variasi (lebih dari satu faktor). Selain itu, dapat juga digunakan untuk

mengetahui adanya interaksi antar grup tertentu dan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan yang signifikan antar variasi (Uji Tukey). Digunakan juga metode ANOVA one way untuk menganalisa data dengan satu faktor yang digunakan untuk melihat pengaruh waktu terhadap penurunan kadar laktosa dari rancangan alat yang dibuat.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan Titik Optimum Konsentrasi Alginat

Enzim laktase diimobilisasi dengan matriks alginat menggunakan metode entrapment dengan variasi konsentrasi alginat. Variasi konsentrasi alginat yang dipakai adalah 2%, 3%

dan 4%(b/v). Pemilihan variasi konsentrasi didasarkan pada penelitian sebelumnya oleh Matandi, 2011 dan Panesar, et al., 2010 di mana konsentrasi terbaik dilaporkan pada kisaran tersebut. Penentuan kondisi imobilisasi yang paling baik dilihat dari banyaknya laktosa yang dapat terpecah dan efisiensi imobilisasi (banyaknya enzim yang terimobil).

Berdasarkan Sisa Konsentrasi Laktosa

Laktosa awal konsentrasi 4% (b/v) sebanyak 15 ml dimasukkan ke dalam kolom berisi enzim terimobil dan dilakukan siklus berulang selama 4 jam. Hasil laktosa yang tersisa dari proses dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Konsentrasi Laktosa Sisa Berdasarkan Konsentrasi Alginat

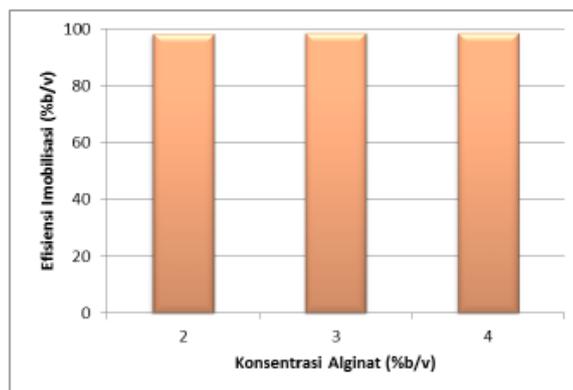
Konsentrasi Alginat (%b/v)	Konsentrasi Laktosa Sisa (%b/v)
2	0,33 ± 0,35
3	0,29 ± 0,19
4	0,15 ± 0,10

Dari uji statistika, diketahui bahwa tidak ada data yang berbeda signifikan. Hal ini berarti konsentrasi variasi alginat tidak memberikan pengaruh signifikan terhadap kinerja enzim. Hal ini mungkin disebabkan pori-pori yang terbentuk antar konsentrasi alginat 2%, 3% dan 4% (b/v) tidak terlalu berbeda sehingga menyebabkan kemampuan substrat untuk masuk ke dalam matriks tidak berbeda signifikan.

Berdasarkan Presentase Efisiensi Imobilisasi

Penentuan efisiensi imobilisasi dilakukan dengan menggunakan metode spektrofotometri UV pada panjang gelombang 280nm.

Pada panjang gelombang ini dapat dideteksi adanya kandungan protein pada sampel. Pada panjang gelombang 280nm protein dalam larutan menyerap sinar UV karena keberadaan asam amino aromatik, terutama tirosin dan triptofan. Kandungan lain pada larutan seperti gula tidak memberikan serapan pada panjang gelombang tersebut. Sampel laktosa hasil siklus berulang diuji untuk mengetahui enzim yang terlepas dari matriks. Dari perhitungan jumlah enzim yang terlepas dari matriks maka akan dapat dihitung efisiensi dari imobilisasi. Dengan menggunakan persamaan regresi linier dari kurva standard diperoleh konsentrasi enzim yang terlepas dari matriks.



Gambar 1. Efisiensi Imobilisasi Berdasarkan Konsentrasi Alginat

Dilihat dari hasil uji statistika, di sini juga diketahui bahwa tidak ada data yang berbeda signifikan. Hal ini berarti dengan konsentrasi alginat 2% (b/v) telah mampu mengimobilisasi enzim laktase dengan baik. Dari hasil perhitungan aktivitas juga didapat bahwa aktivitas enzim rata-rata adalah sebesar 0.045 mmol/menit.

Variasi konsentrasi alginat manapun tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan baik pada konsentrasi laktosa sisa maupun pada efisiensi imobilisasi. Berdasarkan hasil tersebut dipilih untuk menggunakan konsentrasi alginat 2% (b/v). Dilihat dari segi efisiensi pembuatan suatu alat maka konsentrasi alginat 2% (b/v) merupakan kondisi yang terbaik untuk dipilih karena dengan konsentrasi alginat 2% (b/v) sudah dapat diperoleh hasil hidrolisis laktosa yang diharapkan dan efisiensi imobilisasinya yang baik.

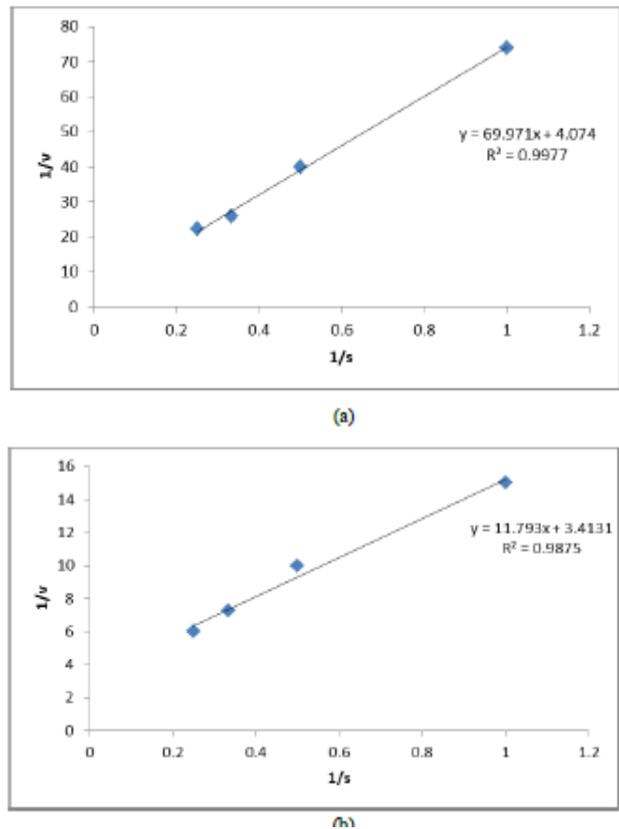
Pengujian Enzim Bebas

Enzim laktase bebas diujikan pada substrat laktosa 4% untuk mengetahui aktivitas dari enzim laktase bebas. Kondisi pengujian enzim bebas disetarakan dengan enzim terimobil. Dari hasil percobaan didapatkan hasil setelah inkubasi selama 15 menit laktosa sisa rata-rata yang terdapat dalam sampel adalah 1.44%. Dari data tersebut dapat dihitung aktivitas enzim rata-rata yaitu sebesar 0.49 mmol/menit. Pengujian enzim bebas ini tidak dilakukan pada suhu optimum dari enzim laktase tersebut karena keadaan disesuaikan dengan kondisi enzim terimobil. Enzim tidak dapat bekerja optimum apabila tidak berada pada kondisi optimumnya. Suhu berpengaruh terhadap kerja

dari enzim. Apabila suhu yang digunakan dibawah suhu optimum maka akan berpengaruh terhadap difusi transfer laktosa dari reaksi ke dalam sisi aktif enzim (Panesar, 2011).

Penentuan K_m dan V_{max} Enzim Terimobil dan Enzim Bebas

Karakterisasi untuk mengetahui sifat dari enzim a.l. dilakukan dengan menentukan nilai K_m dan V_{max} pada enzim terimobil dan pada enzim bebas. V_{max} merupakan kecepatan maksimum enzim dalam mengubah substrat menjadi produk, sedangkan K_m adalah konsentrasi substrat yang diperlukan oleh suatu enzim untuk mencapai setengah kecepatan maksimumnya (Wiseman, 1989). Dalam penentuan K_m dan V_{max} , digunakan berbagai variasi konsentrasi laktosa sebagai substrat enzim, yaitu: laktosa 1%, 2%, 3% dan 4%. Berdasarkan kinetika reaksi enzim, apabila jumlah substrat dalam hal ini adalah laktosa yang digunakan dalam reaksi semakin besar, maka semakin besar aktivitas dari enzim yang mengkatalis reaksi tersebut, begitupun sebaliknya. Hal ini terlihat dari hasil percobaan, dimana dengan semakin meningkatnya konsentrasi laktosa, maka semakin meningkat juga aktivitas dari enzim laktase terimobil untuk memecah laktosa menjadi glukosa dan galaktosa. Parameter kinetika reaksi didapatkan dengan menggambarkan data konsentrasi laktosa yang terpecah dengan waktu pengambilan sampel, kemudian dengan persamaan Lineweaver Burk akan didapat nilai V_{max} dan K_m .



Gambar 2 Grafik Nilai K_m dan V_{max} Enzim Laktase Terimobil (a) dan Enzim Laktase Bebas (b)

Berdasarkan hasil percobaan yang diperoleh, nilai K_m dari enzim laktase terimobil adalah 17.18% dan nilai V_{max} sebesar 0.246 %/min sedangkan nilai K_m dari enzim laktase bebas adalah 3.45% dan nilai V_{max} 0,292 %/min. Apabila dibandingkan nilai K_m dan V_{max} dari enzim laktase bebas dan terimobilisasi, maka dapat dilihat adanya penurunan nilai V_{max} dan kenaikan nilai K_m . Hal ini menunjukkan bahwa proses imobilisasi menggunakan alginat dengan metode entrapment menurunkan kecepatan reaksi dari enzim laktase. Hal ini dapat disebabkan karena pada enzim terimobil substrat harus melewati matriks alginat terlebih dahulu untuk masuk bereaksi dengan enzim sehingga kecepatan produk yang dihasilkan akan lebih lambat dibandingkan dengan kinerja enzim laktase bebas untuk menghasilkan produk. Kecepatan reaksi enzim terimobil juga pernah dilaporkan rendah akibat adanya pengaruh difusi substrat yang cukup lama agar dapat berinteraksi dengan enzim karena harus melalui butiran kalsium alginat sebelum bereaksi dengan sisi aktif enzim (Yuningtyas, 2004). Pada nilai K_m didapatkan data bahwa

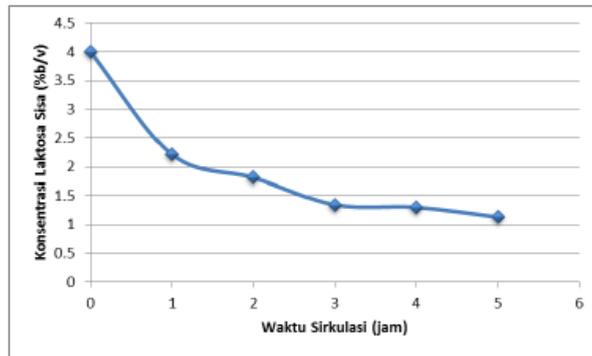
pada enzim terimobil jauh lebih besar daripada enzim bebas yaitu sebesar 17,18%. Hal ini berarti untuk mencapai setengah dari kecepatan maksimum dibutuhkan konsentrasi substrat sebesar 17,18%. Dari hasil tersebut dapat dilihat bahwa kerja enzim laktase terimobil yang dilakukan tidak pada kondisi optimum, karena pada penggunaannya hanya digunakan substrat sebanyak 4%. Hal inilah yang menyebabkan kinerja enzim laktase terimobil tidak optimum.

Uji Rancangan Alat

Rancangan alat sederhana dibuat dengan menggunakan alat-alat seperti erlenmeyer, pompa peristaltik, selang dan kolom. Prinsip yang digunakan pada alat adalah prinsip peristaltik dimana substrat yang berada dalam erlenmeyer yang dihubungkan pada pompa dengan selang pertama, akan ditarik naik oleh pompa melewati selang kedua untuk masuk ke dalam kolom. Di dalam kolom terdapat beads enzim terimobil sehingga substrat akan berinteraksi dengan enzim terimobil. Substrat yang berada di dalam kolom nantinya akan kembali jatuh ke dalam erlenmeyer. Melalui

proses tersebut maka terjadi siklus berulang di mana substrat akan dapat dipecah oleh enzim terimobil sehingga kadar laktosa setelah proses sirkulasi akan mengalami penurunan. Rancangan alat menggunakan enzim terimobil dengan konsentrasi alginat 2% (b/v). Kondisi proses sama dengan proses penentuan

konsentrasi terbaik alginat yang sebelumnya telah dilakukan, tetapi dalam skala yang lebih besar. Laktosa awal yang digunakan sebanyak 150 ml dengan konsentrasi 4% (b/v) dan enzim yang digunakan 90 mg (6mg/ml) dan digunakan pompa peristaltik dengan laju alir 2ml/s.



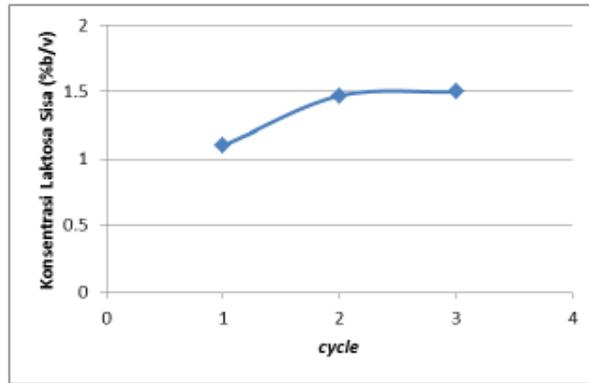
Gambar 3. Penurunan Kadar Laktosa pada Rancangan Alat Selama 5 jam

Berdasarkan hasil multiple comparison Tukey didapatkan hasil bahwa penurunan kadar laktosa awal memiliki perbedaan signifikan dengan penurunan pada jam pertama sampai kelima. Kadar laktosa pada jam pertama juga memiliki perbedaan signifikan dengan penurunan pada jam kedua sampai kelima. Penurunan kadar laktosa pada jam kedua juga berbeda signifikan dengan penurunan pada jam ketiga sampai kelima. Penurunan kadar laktosa pada jam ketiga sampai kelima tidak berbeda signifikan. Dari hasil dapat dilihat penurunan konsentrasi laktosa yang paling besar terjadi pada jam pertama yaitu sebesar 1,79%. Hal ini dikarenakan substrat masih berada dalam jumlah besar sehingga kecepatan reaksinya tinggi. Konsentrasi substrat yang rendah menyebabkan kecepatan reaksi juga rendah tetapi kecepatan akan meningkat dengan meningkatnya konsentrasi substrat (Yuningtyas, 2011). Namun, seiring dengan meningkatnya konsentrasi substrat, pada akhirnya akan tercapai titik optimum, dan setelah titik ini dilampaui, kecepatan reaksi hanya akan meningkat sedemikian kecil dengan bertambahnya konsentrasi substrat. Pada batas ini, enzim menjadi jenuh oleh substratnya dan tidak dapat berfungsi lebih cepat (Lehninger

2004). Ketika substrat telah berkurang menjadi 2,21% maka terjadi penurunan kinerja enzim sehingga pada jam berikutnya konsentrasi laktosa sisa hanya mengalami penurunan sebanyak 0,4% menjadi 1,81%. Hal ini disebabkan berkurangnya substrat menurunkan kecepatan reaksi enzimatik. Dari hasil rancangan alat didapatkan bahwa setelah siklus 5 jam didapatkan konsentrasi laktosa sisa rata-rata 1,13%. Hasil yang didapatkan mendekati mencapai konsentrasi laktosa sisa yang diharapkan yaitu 1%.

Pengaruh Jumlah Pemakaian Enzim Terimobil pada Rancangan Alat

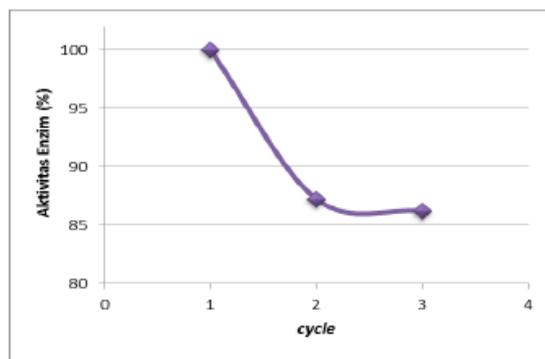
Salah satu kelebihan penggunaan enzim terimobil adalah lebih mudah memisahkan produk yang dihasilkan, sistem yang lebih stabil dan penggunaan kembali biokatalis (Yuningtyas, 2011). Penentuan jumlah pemakaian enzim laktase terimobil dilakukan dengan cara menggunakan kembali enzim terimobil yang sama dengan substrat laktosa awal 4% (b/v) sebanyak n kali hingga aktivitasnya menunjukkan penurunan yang signifikan apabila dibandingkan enzim terimobilisasi awal.



Gambar 4. Konsentrasi Laktosa Sisa Pada Penggunaan Kembali Enzim Terimobil

Laktosa awal yang digunakan adalah 4% (b/v) sebanyak 150 ml. Dari hasil tersebut dapat dilihat adanya kenaikan konsentrasi laktosa yang tersisa dalam reaksi dari penggunaan

enzim terimobilisasi pertama hingga penggunaan ke-3. Sejalan dengan itu, aktivitas yang dihasilkan turun dengan semakin bertambahnya jumlah penggunaan.



Gambar 5. Penurunan Aktivitas Enzim pada Penggunaan Enzim Terimobil Berulang 50

Pada penggunaan kedua terjadi penurunan aktivitas dari enzim laktase terimobil sebesar 12%. Berdasarkan hasil uji statistik ditunjukkan bahwa data pada siklus pertama berbeda signifikan dengan siklus kedua, namun penggunaan kedua tidak memiliki perbedaan signifikan dengan penggunaan ketiga. Penurunan yang signifikan pada penggunaan pertama dan kedua ini a.l. dapat disebabkan oleh adanya enzim yang terlepas dari matriks (Gunarti, 1995). Pada penelitian Sebayang (2006), enzim terimobilisasi pada alginat digunakan sebanyak 4 kali dan mengalami penurunan sebesar $\pm 40\%$. Lepasnya enzim dari matriks ini dapat disebabkan kurang rigidnya matriks. Penggunaan matriks alginat dengan matriks lain diduga dapat mengurangi resiko terjadinya *leaching* enzim. Pada penelitian Tanriseven dan Dog'an, (2002) dilakukan

entrapment laktase dari *A.oryzae* dengan matriks campuran alginat dan gelatin dan didapatkan hasil bahwa enzim laktase memiliki stabilitas operasional yang tinggi dan dapat bertahan selama 35 hari tanpa penurunan aktivitas. Pada penelitian Mammarella et al., (2005) dilakukan entrapment laktase dari *K.fragilis* dengan campuran alginat dan K-karagenan dan didapatkan hasil bahwa enzim memiliki aktivitas yang tinggi. Namun jika dilihat dari data *leaching* maka dapat dilihat bahwa enzim yang *leaching* sangat kecil sehingga diduga terdapat faktor lain yang menyebabkan terjadinya penurunan aktivitas enzim karena secara alamiah apabila enzim digunakan berulang kali dapat mengalami penurunan aktivitas.

KESIMPULAN

Konsentrasi alginat 2% (b/v) adalah yang terbaik untuk digunakan dalam proses imobilisasi lactose dengan efisiensi imobilisasi $98,88 \pm 0,188\%$. Proses imobilisasi enzim laktase berpengaruh pada aktivitas dan nilai K_m dan V_{max} . Aktivitas enzim laktase bebas adalah $0,49 \pm 0,01$ mmol/menit dan aktivitas enzim laktase terimobil adalah $0,045 \pm 0,004$ mmol/menit. Nilai K_m dari enzim laktase terimobil adalah 17,18% dan nilai V_{max} sebesar

0,246 %/min. Nilai K_m dari enzim laktase bebas adalah 3,45% dan nilai V_{max} 0,292 %/min. Waktu yang diperlukan enzim terimobil untuk mereduksi kadar laktosa dari 4% (b/v) menjadi $\pm 1\%$ (b/v) berdasarkan kondisi rancangan alat yang dibuat dengan enzim sebanyak 90 mg dan substrat 150 ml adalah 5 jam. Enzim laktase terimobil pada alginat mengalami penurunan aktifitas yang signifikan pada siklus kedua sampai 12% dan penurunan aktivitas sebesar 13,78% pada siklus ketiga.

DAFTAR PUSTAKA

- Christhie, S.D. 2011. Karakterisasi Enzim Glukosa Oksidase (God) Terimobilisasi pada Ca-Bentonit Termodifikasi Asam. Surabaya: Universitas Surabaya.
- Gunarti, I. 1995. Kajian Amobilisasi Protease Bacillus Pumilus dengan Metode Pemerangkapan pada Matriks Alginat. Bogor: Insitut Pertanian Bogor.
- Lehninger AL. 2004. Principles of Biochemistry. Amhrest: Elsevier Science.
- Mammarella, E.J. ,et al. 2005. Predicting The Packed-Bed Reactor Performance With Immobilized Lactase.
- Matandi, V. 2011. Optimasi Amobilisasi Enzim Xylanase Sebagai Penjernih Jus Buah Nanas Menggunakan Metode Response Surface Methodology. Surabaya: Universitas Surabaya.
- Panesar, et al. 2011. Hydrolysis of Milk Lactose In A Packed Bed Reactor System Using Immobilized Yeast Cells. J Chem Technol Biotechnol 2011; 86: 42-46
- Panesar, P.S., Kumari, S., Panesar, R. 2010. Potential Applications of Immobilized β -Galactosidase in Food Processing Industries. Department of Food Engineering & Technology, India.
- Roy, Praveen K, MD. AGAF. 2011. Lactose Intolerance.
- Sanuhaji, Atan. B. 2006. Intoleransi Laktosa. Majalah Kedokteran Nusantara vol.39. no.4. Desember 2006.
- Sebayang, F. 2006. Imobilisasi Enzim Papain dari Getah Papaya dengan Alginat. Jurnal Komunikasi Penelitian vol 18 (2) 2006.
- Sengupta, S. dan Dasgupta, M. 2006. Enzymology.
- Tanriseven A., Dog'an E.S. 2002. A novel method for the immobilization of b-galactosidase. Department of Biochemistry, Gebze Institute of Technology, Turkey.
- Yuningtyas, S. 2011. Purifikasi, Amobilisasi, Dan Karakterisasi B-Galaktosidase dari Enterobacter cloacae Serta Potensinya Terhadap Susu UHT. Bogor: Institut Pertanian Bogor