

Isolasi dan Karakterisasi Enzim Phytase Mikroflora Endofitik Tanaman Kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill)

RINA DELFITA

*Program Studi Pendidikan Biologi STAIN Batusangkar
Jl. Sudirman No. 137 Kuburajo Lima Kaum Batusangkar
E-mail: rinadelfita@gmail.com*

ABSTRACT

Two endophytic fungal phytases is isolated from leaf, stem and root fragments collected from soybean and identified as *Rhizoctonia* sp. and *Fusarium verticillioides*. The phytase production was induced by phytate in medium used. The crude preparations were used in subsequent characterisation studies, pH and temperature optima and compared to other phytases tested, and is thus a promising candidate for animal feed applications. This particular phytase retains activity over a wide range pH value characteristic of the digestive tract and could conceivably be more suited to increasingly hinger feed processing temperatures being today, than corresponding phytase from *Aspergillus niger*.

Key words: Endophytic fungal phytase, soybean, *Rhizoctonia* sp., *Fusarium verticillioides*, characterisation

PENDAHULUAN

Asam phytat (mio-inositol-1,2,3,4,5,6, heksakisfosfat) adalah cadangan fosfor terbesar di dalam biji-bijian, minyak biji-bijian dan polen (Konietzny dan Greiner, 2002; Cao *et al.*, 2005). Asam phytat bersifat anti-nutrisi dan mudah berikatan dengan protein dan mineral-mineral bervalensi dua dan tiga seperti Zn^{++} , Ca^{++} , Mg^{++} , Fe^{++} , Fe^{+++} (Pallauf dan Rimbach, 1996; Martin, Murphy dan Power, 2005; Cao *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007). Pada hewan monogastrik (itik, ayam, ikan dan babi), asam phytat tidak bisa dimanfaatkan karena keterbatasan enzim yang mampu menguraikan asam phytat di dalam saluran pencernaan, akibatnya fosfor anorganik harus ditambahkan ke dalam pakan untuk memenuhi kebutuhan fosfor anorganik.

Untuk memanfaatkan sumber fosfor dan menghilangkan sifat anti-nutrisi dari asam phytat ini dibutuhkan phytase, sehingga phytase akan menjadi enzim yang sangat penting. Banyak penelitian menunjukkan bahwa suplementasi phytase pada pakan mampu meningkatkan penggunaan fosfor yang berikatan dengan asam phytat (Walz dan

Pallauf, 2002). Schafer dan Koppe (1995) melaporkan bahwa penambahan phytase 500 U/kg dalam pakan ikan berbahan dasar tepung kedelai mampu melepaskan fosfor yang berikatan dengan asam phytat mencapai 20%. Suplementasi phytase pada pakan juga menurunkan ekskresi fosfor dalam feses mencapai 50% (Konietzny dan Greiner, 2004). Aplikasi phytase ini bisa meningkatkan bioavailabilitas protein dan mineral-mineral melalui hidrolisis asam phytat dalam saluran pencernaan atau selama proses pembuatan pakan (Reddy *et al.*, 1989). Penambahan phytase 1000 FTU/Kg pada pakan broiler mampu meningkatkan bioavailabilitas asam amino arginin 3,7% dan 4,2% mineral N (Selle *et al.*, 2000) serta 16,6% mineral Ca (Lan *et al.*, 2002).

Phytase tersebar luas di alam karena bisa ditemukan pada mikroorganisme (Shieh dan Ware, 1968; Hawson dan Davis, 1983), tanaman (Lolas dan Markakis, 1977) dan beberapa jaringan hewan (Sandberg dan Anderson, 1988 *cit.* Konietzny dan Greiner, 2004). Aktivitas phytase pada hewan sangat rendah dibanding aktivitas phytase pada tumbuhan dan mikroorganisme (Weremko *et*

al., 1997 *cit.* Cao *et al.*, 2005). Walaupun beberapa tumbuhan mempunyai phytase seperti gandum tetapi kurang efektif karena mempunyai kisaran pH yang sempit. Aktivitas phytase dari tumbuhan rendah pada pH kecil dari 4 dan besar dari 8 serta tidak aktif pada suhu tinggi (di atas 70°C) (Greiner dan Konietzny, 2006), sebaliknya phytase dari mikroorganisme mempunyai kisaran pH optimum yang luas, tahan suhu tinggi dan aktivitas spesifiknya lebih tinggi sehingga menjanjikan untuk diaplikasikan dalam pembuatan pakan ternak (Cao *et al.*, 2006). Beberapa phytase dari mikroorganisme telah dikarakterisasi seperti phytase dari *Escherichia coli* (Greiner, Konietzny dan Jany, 1993), *Bacillus subtilis* (Keovuo, 2000) dan *Aspergillus* (Stefan *et al.*, 2005).

Mikroba endofitik adalah mikroba yang diisolasi dari dalam tanaman yang sehat baik dari akar, batang atau daun. Marlida (2001) menemukan bahwa *Acremonium* sp. Jamur endofitik yang dapat menghasilkan enzim pendegradasi pati yang berasal dari sagu, kentang, beras, gandum dan jagung. Marlida (2003) juga menemukan jamur endofitik penghasil enzim selulase yang dapat mendegradasi selulosa pada limbah pertanian/industri (sabut sawit, sabut kelapa dan serbuk gergaji). Pada daun dan batang tanaman kedelai (*Glycine max*) juga telah dilaporkan 13 jenis jamur endofitik yaitu *Alternaria*, *Cladosporium*, *Chaetomium*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Scopulariopsis*, *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp. dan *Mycelia sterilia* (Pimentel *et al.*, 2006). Namun, informasi tentang mikroba endofitik tanaman kedelai ini dalam menghasilkan phytase masih kurang, sehingga perlu dilakukan penelitian untuk mendapatkan mikroba endofitik penghasil phytase dan mengkarakterisasi enzim yang dihasilkan mikroba tersebut.

METODE PENELITIAN

Materi yang dipergunakan adalah tanaman kedelai varietas merapi, medium seleksi, medium fermentasi, PDA, buffer asetat, buffer Glisin-HCl dan Buffer Tris, asam Phytat, amonium molibdat, asam askorbat, asam sulfat, natrium karbonat, TCA 10%, aluminium foil, tisu dan kapas. Penelitian ini

memakai metode deskriptif dan dilakukan dalam dua tahap. Penelitian tahap I, mengisolasi dan menyeleksi mikroba endofitik dari akar, batang dan daun tanaman kedelai. Penelitian tahap II, melakukan produksi, ekstraksi dan uji aktivitas phytase yang dihasilkan mikroba endofitik tersebut.

Isolasi Mikroba Endofitik

Sampel akar, batang dan daun dicuci dengan akuades dua kali, kemudian dilakukan sterilisasi permukaan berdasarkan metode Pimentel *et al.*, (2006). Sampel kemudian diinokulasikan ke dalam medium seleksi yang mengandung 1,5 g glukosa, 0,2 g NH_4NO_3 , 0,05 g KCl, 0,05 g MgSO_4 , 0,03 g FeSO_4 dan 0,03 g MnSO_4 dan 0,05 g asam Phytat dalam gelas piala yang berisi 100 ml akuades (pH 5,5). Mikroba yang tumbuh pada medium seleksi diinokulasi kembali ke dalam cawan petri steril berisi medium seleksi yang baru secara penggoresan dengan metoda kuadran, selanjutnya diinkubasi pada suhu ruangan selama 2-5 hari, sampai terlihat koloni-koloni tunggal yang tumbuh. Mikroba tunggal kemudian ditumbuhkan dalam medium PDA untuk identifikasi dan sebagai stok.

Identifikasi Mikroba Endofitik

Mikroba endofitik yang didapatkan diidentifikasi dengan mengamati secara makrologi terhadap bentuk dan warna koloni dan secara mikrologi di bawah mikroskop dan dibandingkan dengan deskripsi berdasarkan Samson dan van Reenen-Hoekstra (1988) dan Barnett dan Hunter (1972).

Produksi dan Ekstraksi

Produksi phytase dilakukan berdasarkan metode Kim dan Lei (2005) dengan membiakan mikroflora pada medium yang mengandung 1,5 g glukosa, 0,2 g NH_4NO_3 , 0,05 g KCl, 0,05 g MgSO_4 , 0,03 g FeSO_4 dan 0,03 g MnSO_4 dan 0,05 g asam Phytat dalam gelas piala yang berisi 100 ml akuades (pH 5,5).

Pengukuran Aktivitas Enzim

Aktivitas enzim dilakukan dengan metode Ke dalam tabung reaksi dimasukkan 0,2 ml supernatan enzim inkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit. Tambahkan 0,2 ml asam Phytat dalam buffer asetat pH 5,5. Setelah itu

diinkubasikan pada suhu 37°C selama 15 menit dan kemudian dihentikan reaksi dengan menambahkan 0,4 ml TCA 10%. Sentrifus campuran enzim substrat pada 2000 rpm selama 10 menit. Pindahkan supernatan ke dalam tabung reaksi baru. 0,2 ml supernatan dicampurkan dengan akuades sebanyak 1,8 ml. Kemudian ditambahkan 2 ml regen (1 M asam sulfat dan 2,5% amonium molibdat dan 10% asam askorbat dengan perbandingan 3:1:1) lalu homogenkan. Inkubasi campuran pada suhu 50°C selama 15 menit dan dinginkan lalu ukur absorbansi masing-masing sampel pada 420 nm. Pengujian dilakukan dengan empat kali ulangan. Prosedur yang sama dilakukan untuk larutan standar kalium fosfat dan blanko. Pengukuran blanko caranya sama dengan perlakuan sampel, hanya pada blanko ekstrak kasar enzim 0,2 ml yang digunakan terlebih dahulu dinonaktifkan dengan cara menambahkan 0,4 ml TCA 10%. Standar dibuat dari larutan 0,3834 g KH_2PO_4 dalam 100 ml akuades dan diencerkan 100 kali, sehingga tiap mililiter larutan mengandung 0,03834 mg KH_2PO_4 . Seri standar dibuat dengan mengambil 0, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 3 dan 4 ml larutan standar dan ditambahkan dengan 2 ml regen. Aktivitas enzim dinyatakan dalam unit/ml, yang merupakan $\mu\text{mol PO}_4^{3-}$ yang dilepas per menit per mililiter enzim. Aktivitas enzim ditentukan dengan rumus:

$$\text{AE} = \frac{\text{MG} \times 1000}{\text{BM} \times \text{MI}}$$

Keterangan: AE = Aktivitas enzim (U/ml ekstrak kasar enzim)
 MG = mg fosfat
 BM = Berat molekul kalium fosfat
 MI = Waktu inkubasi enzim substrat

Pengukuran pH dan Suhu Optimum Aktivitas Enzim

Pengukuran pH dengan cara membuat variasi pH buffer yaitu 2, 3, 4, 5, 6, 7 dan 8. Pengukuran suhu optimum dilakukan dengan bervariasi suhu yaitu 28, 30, 40, 50, 60, 70 dan 80. Aktivitas phytase dilakukan berdasarkan metoda Kim dan Lei (2005).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Mikroba Endofitik Tanaman Kedelai

Setelah dilakukan isolasi pada medium selektif yang mengandung asam Phytat sebagai inducer Phytase, diperoleh hasil 34 isolat seperti yang dapat dilihat pada Tabel 1.

Dari Tabel 1, dapat dilihat bahwa mikroba endofitik yang terdapat pada tanaman kedelai cukup banyak dimana pada akar tanaman kedelai ditemukan 11 isolat, batang 9 isolat dan daun 14 isolat. Hal ini menunjukkan bahwa tanaman kedelai banyak mengandung mikroba dan berbeda jumlahnya tergantung organ tanaman. Hal ini senada dengan pernyataan Tan dan Zou, 2001 *cit.* (Radji 2005), bahwa setiap tanaman tingkat tinggi dapat mengandung beberapa mikroorganisme endofitik yang mampu menghasilkan senyawa biologi atau metabolit sekunder Pimentel *et al.* (2006) melaporkan bahwa pada akar batang dan daun tanaman kedelai (*Glycine max*) ditemukan 13 jenis mikroba (jamur) endofitik yaitu *Alternaria*, *Cladosporium*, *Chaetomium*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Scopulariopsis*, *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp. Dan *M. Sterilia*.

Tabel 1. Jumlah isolat mikroba endofitik yang berhasil diisolasi dari dalam tanaman kedelai

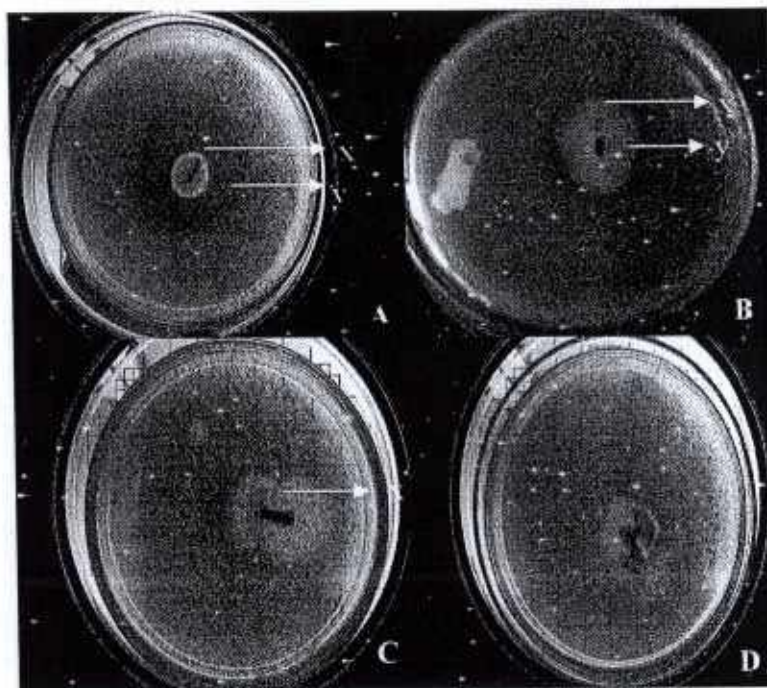
No	Organ Tanaman	Jumlah Isolat
1	Akar	11
2	Batang	9
3	Daun	14
Jumlah		34

Seleksi Mikroba Endofitik dalam Memproduksi Phytase

Dari 34 isolat mikroba yang tumbuh pada medium seleksi yang mengandung asam phytat, hanya ditemukan dua isolat yang mempunyai kemampuan dalam mendegradasi asam phytat yang ditandai dengan adanya zona bening di sekeliling koloni seperti yang terlihat pada Gambar 2^a dan 2B. Kedua isolat tersebut yaitu isolat nomor Y2 dan isolat nomor Y4, yang diisolasi dari akar tanaman, sedangkan 32 isolat lainnya tidak menunjukkan adanya zona bening di sekeliling koloni.

Kedua isolat yang menghasilkan phytase hanya ditemukan pada akar tanaman kedelai. Hal ini berarti bahwa phytase yang dihasilkan kedua isolat ini berhubungan erat

dengan fisiologi akar tanaman kedelai. Akar tanaman berperan dalam menyerap unsur hara dan secara alami mempunyai mekanisme yang khusus dalam hal penyerapan unsur hara (fosfor) yang berikatan dengan asam phytat tersebut untuk pertumbuhan tanaman. Asam phytat akan diserap dan dihidrolisis menjadi fosfor sebelum memasuki batang dan daun. Tan dan Zou, 2001 dalam (Radji 2005) menyatakan bahwa kemampuan mikroorganisme endofitik dalam menghasilkan metabolit sekunder (enzim) sesuai dengan fisiologi tanaman inangnya. Sintesis phytase oleh kedua isolat merupakan respon dari adanya perubahan kebutuhan fisiologi (Trudy, 1999) dan ditentukan oleh gen yang terdapat di dalam kromosom (Rhodes dan Fletcher, 1966).



Gambar 2. Pembentukan zona bening oleh isolat mikroba endofitik tanaman kedelai yang ditumbuhkan pada medium seleksi yang mengandung asam phytat. A-B = terbentuk zona bening; C-D = tidak terbentuk zona bening; A = isolat nomor Y2 (diisolasi dari akar); B = isolat nomor Y4 (diisolasi dari akar); C = isolat nomor Y8 (diisolasi dari batang) dan D = isolat nomor Y9 (diisolasi dari daun); x = miselium y = zona bening.

Zona bening yang terbentuk pada wilayah di sekeliling koloni terjadi karena adanya hidrolisis asam phytat menjadi fosfor oleh

phytase ekstraseluler yang dihasilkan oleh kedua isolat yang berdifusi ke dalam medium. Menurut Selle *et al.* (2006) bahwa mikroorganisme yang menghasilkan phytase ekstra-

seluler mampu menghidrolisis asam phytat menjadi fosfor, sehingga wilayah di sekeliling koloni terlihat jernih. Fosfor yang dihasilkan dari proses penguraian asam phytat ini larut dalam media sehingga kekeruhan di sekeliling koloni hilang seperti yang terlihat pada Gambar 2A dan 2B.

Pada Gambar 2A dan 2B juga dapat dilihat bahwa isolat nomor Y2 mempunyai diameter zona bening lebih besar (0,7 cm) dibanding dengan isolat nomor Y4 (0,3 cm). Perbedaan diameter kedua isolat ini disebabkan karena perbedaan kemampuan isolat dalam menghidrolisis asam Phytat menjadi fosfor. Cao *et al.* (2005) menyatakan bahwa kemampuan aktivitas phytase berbeda tergantung sumber enzim. Sedangkan pada Gambar 2C dan 2D (batang: isolat nomor Y8 dan daun: isolat nomor Y9) tidak terbentuk zona bening karena kedua isolat tidak menghasilkan phytase. Isolat yang tidak membentuk zona bening di sekeliling koloni ini memanfaatkan fosfor selain yang berasal dari asam phytat atau tumbuh dengan memanfaatkan fosfor yang merupakan hasil perombakan asam phytat dari mikroba yang menghasilkan phytase.

Zona bening yang terbentuk di sekeliling koloni pada medium seleksi yang mengandung asam phytat menandakan bahwa sintesis phytase kedua isolat ini tergantung ada atau tidaknya asam phytat di dalam medium pertumbuhan. Hal ini dapat dikatakan bahwa sintesis phytase dari isolat nomor Y2 dan nomor Y4 diinduksi oleh asam phytat yang ada di dalam medium pertumbuhan. Beberapa penelitian juga menunjukkan bahwa sintesis phytase ekstraseluler berbeda tergantung jenis mikroba. Phytase pada *Bacillus* (Powar dan Jagannathan, 1982; Choi *et al.*, 2001), *C. Crusei* (Quan *et al.*, 2001),

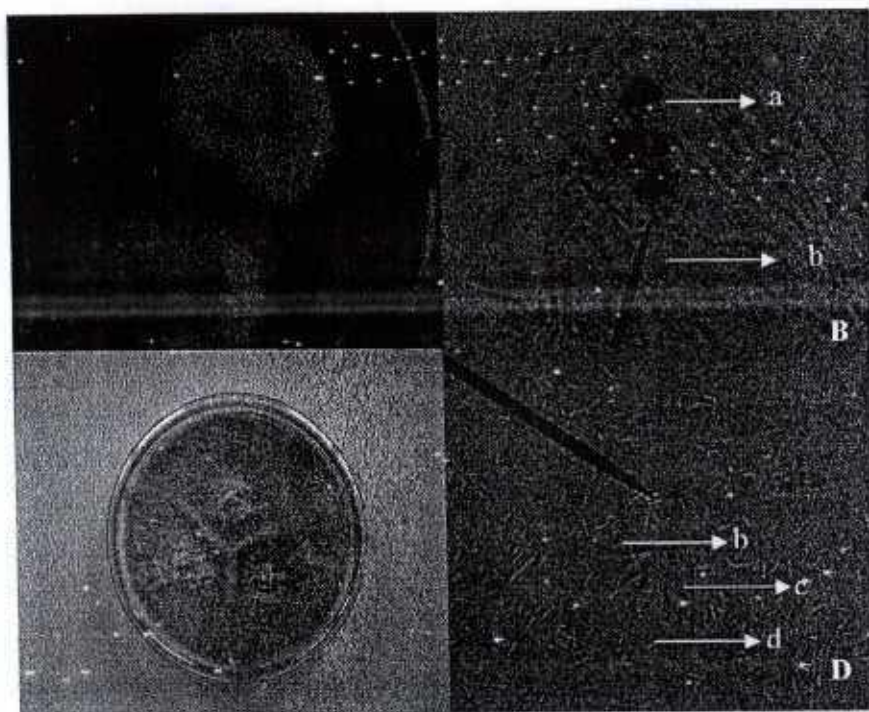
A. Oryzae (Fujita *et al.*, 2003) dan *Klebsiella* (Shah dan Parekh, 1990) diinduksi oleh asam phytat pada medium pertumbuhan. Sedangkan pada *E. Coli*, produksi phytase diinduksi oleh adanya fosfor (Greiner *et al.*, 1997).

Identifikasi Mikroba Endofitik

Setelah dilakukan seleksi, dilakukan identifikasi jenis isolat. Identifikasi dari kedua isolat dilakukan berdasarkan Samson dan van-Reenen-Hoekstra (1988) dan Barnett dan Hunter (1972). Identifikasi jenis isolat dilakukan dengan cara mengamati bentuk koloni, warna koloni, permukaan koloni (seperti kapas atau tidak), mengubah warna medium atau tidak, hifa bersekat atau tidak, dan tipe konidia dari isolat.

Dari hasil pengamatan yang telah dilakukan terlihat koloni berwarna krem pekat dengan bagian pinggir koloni memutih dan permukaan koloni seperti beludru, mengubah warna medium menjadi merah, tubuh buah dan spora tidak ada, mempunyai sklerotia kecil dengan susunan yang longgar dan berwarna coklat serta berhubungan dengan hifa utama, hifa bersekat dan berwarna coklat. Deskripsi ini sesuai dengan deskripsi *Rhizoctonia* sp. (Barnett dan Hunter, 1972), seperti yang terlihat pada Gambar 3°.

Dari pengamatan terhadap isolat nomor Y4, koloni terlihat berwarna putih, permukaan koloni seperti kapas dan mengubah medium menjadi ungu. Makrokonidia dibentuk pada cabang lateral dari hifa dan terdiri dari makrokonidia berbentuk sabit dengan kedua ujung meruncing, umumnya bersekat tiga sampai lima, mempunyai phialid dua sampai tiga (Gambar 3B), sesuai dengan deskripsi *Fusarium verticillioides* (Samson dan van-Reenen-Hoekstra, 1988).



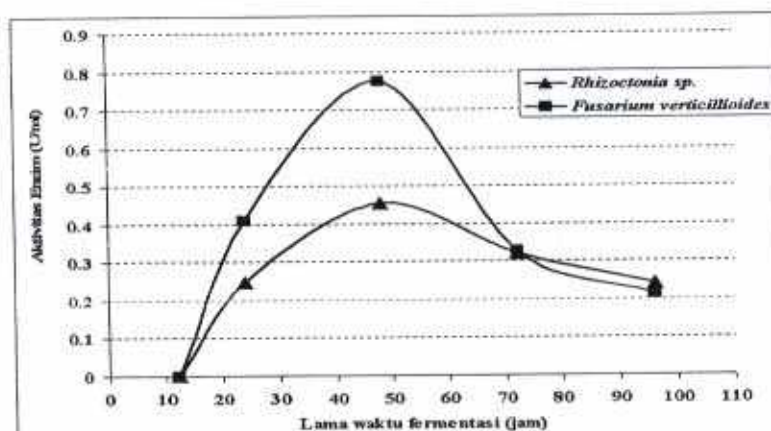
Gambar 3. Mikroba endofitik yang diisolasi dari tanaman kedelai. A-B = *Rhizoctonia* sp.; C-D = *F. Verticillioides*; A = bentuk makroskopis; B = bentuk mikroskopis (perbesaran 100x); C = bentuk makroskopis; D = bentuk mikroskopis (perbesaran 100x); a = sklerotia; b = hifa; c = phialid; d = makrokonidia.

Uji Aktivitas Phytase

Kedua isolat yaitu *Rhizoctonia* sp. Dan *F. Verticillioides* yang menghasilkan zona bening ditumbuhkan pada medium cair (medium fermentasi) yang mengandung asam phytat sebagai sumber fosfor dan dilakukan pencuplikan sampel untuk mengetahui waktu fermentasi yang menghasilkan aktivitas tertinggi, maka didapatkan hasil seperti yang terlihat pada Gambar 4.

Pada Gambar 4. dapat dilihat bahwa waktu untuk memproduksi phytase dari kedua isolat adalah setelah 24 jam inkubasi. Produksi phytase meningkat sesuai dengan

pertambahan waktu inkubasi dan mencapai produksi enzim maksimum pada 48 jam inkubasi. Produksi enzim pada kedua isolat menurun setelah 48 jam inkubasi. Hal ini menunjukkan bahwa produksi phytase dari kedua isolat tertinggi pada 48 jam inkubasi. Produksi phytase yang tinggi pada 48 jam inkubasi berhubungan dengan saat dimana enzim tertinggi diproduksi kedua isolat tersebut, yaitu pada fase stasioner. Konieczny dan Greiner (2004), menyatakan bahwa sintesis phytase dari mikroorganisme adalah pada fase awal stasioner dan mencapai puncak produksi pada akhir fase stasioner.



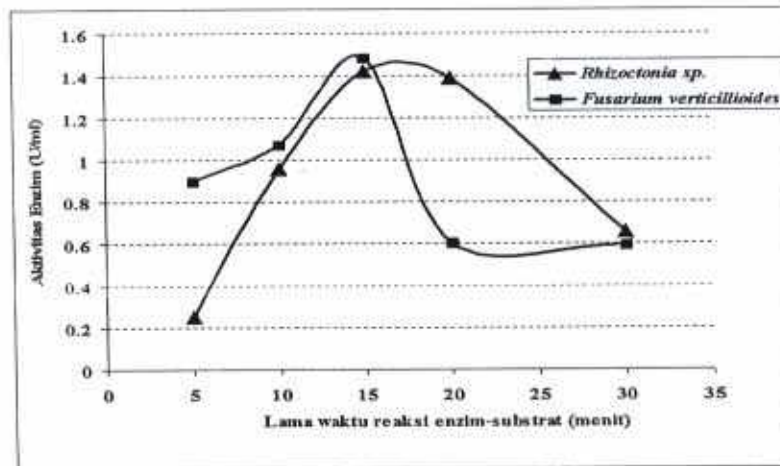
Gambar 4. Lama waktu produksi Phytase dari *Rhizoctonia sp* dan *F. Verticillioides*

Pada Gambar 4 juga dapat dilihat bahwa aktivitas phytase *Rhizoctonia sp.* dan *F. Verticillioides* pada 48 jam inkubasi adalah 0.46 U/ml dan 0.78 U/ml. Aktivitas phytase *Rhizoctonia sp.* Lebih besar dibanding *F. Verticillioides* (pengukuran aktivitas secara kualitatif), sedangkan aktivitas enzim yang diukur secara kuantitatif menunjukkan hal yang sebaliknya. Hal ini berarti bahwa aktivitas enzim yang diukur secara kualitatif tidak selalu memperlihatkan hasil yang sama atau dapat dikatakan bahwa besarnya diameter zona bening tidak selalu menunjukkan besarnya aktivitas suatu enzim. Wards (1983) menyatakan bahwa pendekatan dengan cara menghubungkan tingkat produktivitas dengan ukuran diameter zona bening yang terbentuk di sekeliling koloni pada medium padat dengan kemampuan mikroorganisme yang bersangkutan menghasilkan enzim dalam medium cair tidaklah selalu sama. Aktivitas kedua isolat ini hampir sama dengan aktivitas phytase dari *B. Coagulans* yaitu 0.59 U/ml (Widowati *dkk.*, 1998).

Setelah dilakukan pencuplikan sampel dan diketahui waktu produksi enzim yang tertinggi, maka dilakukan pengujian lama waktu reaksi enzim yang dihasilkan oleh *Rhizoctonia sp.* dan *F. Verticillioides* tersebut dalam menguraikan asam phytat menjadi fosfor. Lama waktu reaksi enzim untuk meng-

uraikan substrat (asam phytat) menjadi fosfor pada masing-masing isolat dapat dilihat pada Gambar 5.

Pada Gambar 5 dapat dilihat bahwa reaksi phytase dengan asam phytat berlangsung setelah lima menit inkubasi. Aktivitas enzim kedua isolat meningkat sesuai dengan peningkatan waktu inkubasi dan mencapai aktivitas maksimum pada 15 menit inkubasi. Aktivitas enzim kedua isolat menurun setelah 15 menit inkubasi. Aktivitas enzim yang didapatkan setelah diinkubasi selama 15 menit pada isolat nomor Y2 adalah 1,42 U/ml dan isolat no Y4 adalah 1,48 U/ml. Hal ini menunjukkan bahwa kedua isolat mempunyai kemampuan tertinggi menguraikan asam phytat menjadi fosfor pada waktu 15 menit inkubasi. Waktu phytase dalam menguraikan asam phytat menjadi fosfor berbeda tergantung mikroorganisme penghasil phytase. Phytase dari *A. Fumigatus* memperlihatkan aktivitas maksimum setelah diinkubasi selama 10 menit (Martin *et al.*, 2005). Aktivitas phytase *A. Oryzae* yang diisolasi dari Koji adalah 1,5 U/ml dengan waktu inkubasi enzim dengan substrat selama 20 menit (Fujita *et al.*, 2003). Sedangkan aktivitas phytase enzim komersial Allzyme, *A. Fumigatus* (Martin *et al.*, 2005) dan *P. Anomala* (Vohra dan Satyanarayana, 2002) adalah 10 menit.



Gambar 5. Lama waktu reaksi Phytase dengan asam Phytat (substrat) *Rhizoctonia sp* dan *F. Verticillioides*.

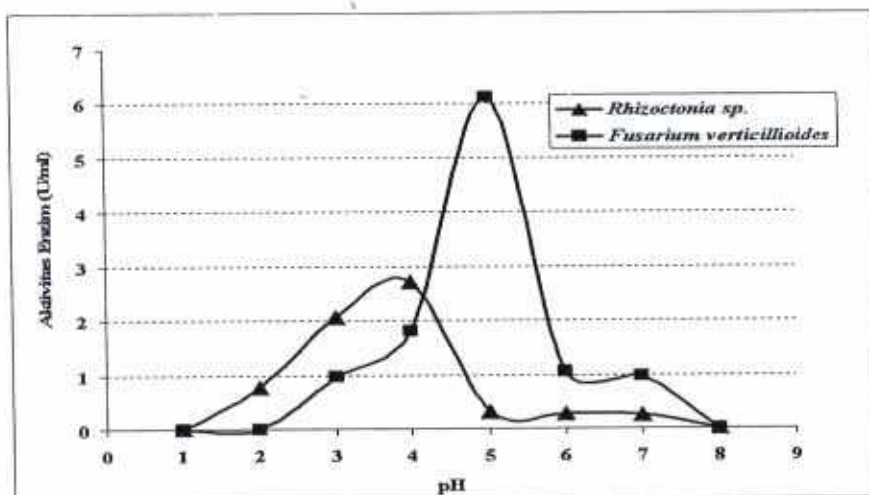
Karakterisasi Phytase

Setelah diketahui waktu produksi enzim dan waktu reaksi penguraian asam phytat menjadi fosfor tertinggi dari *Rhizoctonia sp.* Dan *F. Verticillioides*, maka dilakukan karakterisasi enzim yaitu pH dan suhu. Penentuan pH dan suhu optimum enzim dilakukan berkaitan dengan sifat-sifat protein seperti ke-

kuatan interaksi antara asam-asam amino yang secara umum akan menyebabkan protein menjadi tidak stabil.

pH

Aktivitas phytase *Rhizoctonia sp.* Dan *F. Verticillioides* pada beberapa tingkatan pH dari dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Aktivitas Phytase *Rhizoctonia sp.* dan *F. Verticillioides* pada beberapa tingkatan pH

Pada Gambar 6 dapat dilihat bahwa secara umum kisaran pH aktivitas phytase dari *Rhizoctonia sp.* Dan *F. Verticillioides* adalah pH 2 – 7. Hal ini menunjukkan bahwa kedua isolat mempunyai aktivitas pada kisaran pH

yang luas. Kisaran pH aktivitas enzim yang luas dari kedua isolat ini memungkinkan untuk diaplikasikan ke dalam pakan ternak karena berpotensi tetap aktif di sepanjang saluran pencernaan. Kisaran pH aktivitas

enzim kedua isolat ini sama dengan kisaran pH aktivitas phytase yang dihasilkan oleh *A. Fumigatus*, Allzyme dan Natuphos (enzim komersial) yaitu pH 2 – 7 (Martin *et al.*, 2005). Fujita *et al.* (2003) juga melaporkan bahwa kisaran pH aktivitas phytase dari *A. Oryzae* yang diisolasi dari Koji adalah pH 1 – 7.5.

Aktivitas phytase dari *Rhizoctonia* sp. Meningkat sesuai dengan peningkatan pH dan mencapai aktivitas optimum pada pH 4 dan terjadi penurunan aktivitas enzim pada pH diatas 4 serta tidak ada aktivitas enzim pada pH 8. Aktivitas phytase dari *F. Verticillioidea* juga meningkat seiring dengan peningkatan pH dan mencapai aktivitas tertinggi pada pH 5 serta tidak ada aktivitas pada pH 8. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas optimum phytase *Rhizoctonia* sp. Adalah pada pH 4 dan *F. Verticillioidea* pada pH 5, dimana nilai pH optimum aktivitas enzim kedua isolat berturut-turut adalah 2,72 U/ml dan 6,11 U/ml.

Adanya perbedaan pH optimum dari kedua isolat ini karena adanya perbedaan jenis mikroba penghasil phytase. pH optimum aktivitas enzim berbeda tergantung sumber enzim (Cao *et al.*, 2005) dan pada umumnya 4,4 sampai 8 (Scott, 1991). Phytase dari *A. Fumigatus* mempunyai pH optimum 5,5 (Martin *et al.*, 2005), phytase dari *P. Anomala* mempunyai pH optimum 4 (Vohra dan Satyanarayana, 2002) sedangkan phytase dari *A. Oryzae* yang diisolasi dari Koji mempunyai pH optimum 2 (Fujita *et al.*, 2003). Aktivitas phytase dari *S. Auranthigriseus* adalah pada pH 5,5, sedangkan aktivitas dari *B. Coagulans* optimum pada pH 6,5 (Widowati *dkk.*, 1998).

Pada Gambar 6. juga dapat dilihat bahwa aktivitas phytase *Rhizoctonia* sp. Dan *F. Verticillioidea* pada pH di bawah dan di atas kondisi optimum rendah disebabkan bagian sisi aktif yang mengandung gugus fungsi dan konformasi atau struktur tiga dimensi enzim berada dalam kondisi kurang mantap sehingga aktivitas katalitiknya rendah. Hal ini disebabkan karena adanya penggantian gugus pada residu asam amino sehingga menyebabkan aktivitas enzim turun. Perubahan pH menyebabkan ionisasi pada struktur primer dan struktur sekunder protein, juga menyebabkan perubahan interaksi antara satu asam amino dengan asam amino lainnya yang bertanggung jawab dalam pembentukan struktur tiga di-

mensi enzim. Trudy dan James (1999) menyatakan bahwa sisi aktif dan struktur tiga dimensi enzim menentukan aktivitas katalitik enzim. Denaturasi protein akan menyebabkan hilangnya aktivitas enzim. Sebagian enzim akan hilang aktivitasnya dengan pemecahan satu atau beberapa ikatan peptidanya. Sedangkan sebagian enzim akan dapat mempertahankan aktivitasnya meskipun beberapa ikatan peptidanya telah pecah atau malahan dapat menjadi lebih reaktif.

Pada Gambar 6. juga dapat dilihat bahwa phytase yang dihasilkan kedua mikroba tersebut bersifat asam, yang berarti bahwa kedua isolat ini tergolong phytase yang bersifat asam (acid phytase). Konietzny dan Greiner (2002) melaporkan bahwa pH optimum phytase yang bersifat asam yaitu berkisar 5.

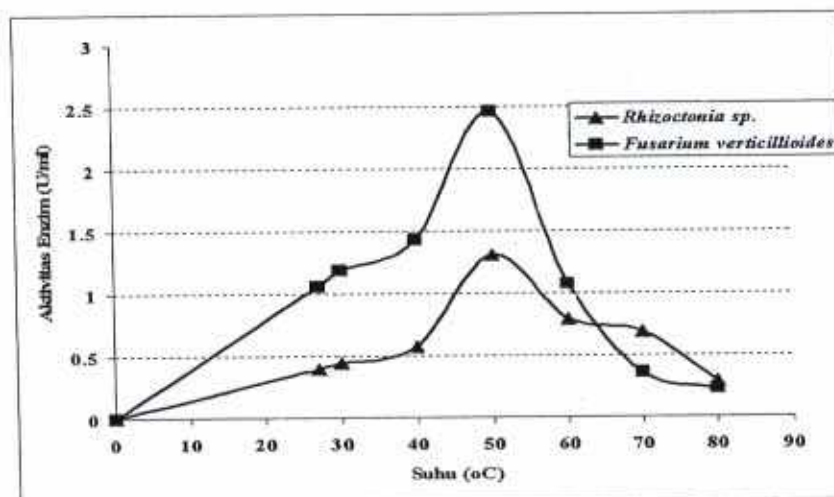
Suhu

Aktivitas enzim dari *Rhizoctonia* sp. Dan *F. Verticillioidea* pada beberapa tingkatan suhu dapat dilihat pada Gambar 7. Pada Gambar 7. dapat dilihat bahwa phytase dari *Rhizoctonia* sp. Dan *F. Verticillioidea* mempunyai kisaran suhu aktivitas 27 – 80°C. Hal ini menunjukkan bahwa kedua mikroba mempunyai kisaran suhu aktivitas yang luas. Kisaran suhu aktivitas enzim tergantung sumber enzim (Cao *et al.*, 2005) yang pada umumnya adalah 36 – 63°C (Wodzinski dan Ullah, 1996). Suhu aktivitas phytase dari *A. Fumigatus* adalah 20-70°C (Martin *et al.*, 2005) sedangkan kisaran suhu optimum aktivitas phytase dari *A. Oryzae* yang diisolasi dari Koji adalah 20 – 100°C (Fujita *et al.*, 2003).

Phytase yang dihasilkan *Rhizoctonia* sp. Dan *F. Verticillioidea* mencapai aktivitas maksimum pada suhu 50°C. Hal ini menunjukkan bahwa kedua mikroba tersebut mempunyai aktivitas optimum pada suhu 50°C. Pada keadaan optimum ini kecepatan reaksi enzim paling cepat. Reaksi enzim meningkat dua kali lipat pada setiap kenaikan suhu 10°C hingga mencapai suhu tertentu (Trudy dan James, 1999) dan tergantung sumber enzim (Cao *et al.*, 2005). Kenaikan suhu diatas suhu optimum menyebabkan enzim terdenaturasi sehingga aktivitas katalitiknya berkurang (Trudy dan James, 1999; Campbell, Reece dan Mitchell, 2000). Dari data yang didapatkan terlihat pada suhu di atas 50°C

terjadi penurunan aktivitas enzim kedua isolat (Gambar 7). Turunnya aktivitas phytase kedua isolat disebabkan perubahan konformasi pada struktur tiga dimensi enzim yang mengakibatkan enzim menjadi tidak stabil sehingga aktivitas enzim berkurang, bahkan hilang. Campbell, Reece dan Mitchell (2000)

menyatakan bahwa kecepatan reaksi enzimatik akan menurun drastis di atas suhu optimum akibat adanya gangguan pada ikatan hidrogen, ikatan ionik dan interaksi lainnya yang menstabilkan konformasi aktif enzim, sehingga enzim mengalami denaturasi.



Gambar 7. Aktivitas Phytase *Rhizoctonia* sp. Dan *F. Verticillioides* pada beberapa tingkatan suhu.

Aktivitas phytase *Rhizoctonia* sp. Pada suhu 50°C adalah 1,3 U/ml, sedangkan aktivitas phytase *F. Verticillioides* adalah 2,46 U/ml. Adanya perbedaan aktivitas dari kedua mikroba ini disebabkan adanya perbedaan sumber enzim, karena setiap enzim mempunyai karakteristik aktivitas yang berbeda tergantung jenis mikroorganisme (Cao *et al.*, 2005). Suhu optimum dari phytase bervariasi tergantung sumber mikroorganisme yaitu 45 – 77°C (Martin *et al.*, 2005). Suhu optimum dari kedua isolat ini sama dengan suhu optimum dari enzim komersial Allzyme (Martin *et al.*, 2005; Cao *et al.*, 2007). Fujita *et al.* (2003) melaporkan bahwa aktivitas phytase *A. Oryzae* yang diisolasi dari Koji adalah 1,5 U/ml pada suhu 30°C. Aktivitas phytase dari *S. Auranthigriseus* adalah 0,0002 U/ml pada suhu 55°C.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

- Barnett HL and Hunter BB. 1972. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Third Edition. Burgess Publishing Company. USA.
- Cao LW, Wang C, Yang Y, Yang J, Diana A, Yakupitiyage Z, Luo and Lie D. 2007. Application of Microbial Phytase in Fish Feed. *J. Enzyme and Microbial Technology*. 40: 497-507.
- Cheryan M. 1980. Phytic Acid Interactions in Food Systems. *Food Sci. Nutr*. 13: 297-335.
- Chappell NA, Reece JB and Mitchell LG. 2000. *Biology. Fifth Edition*. Addison Wesley Longman. California.
- Choi YM, Suh HJ and Kim JM. 2001. Purification and Properties of Extracellular Phytase from *Bacillus* sp.. *J. Protein Chem*. 20 (4): 287-292.
- Fujita J, Yamane YI, Fukada H, Kizaki Y, Wakabayashi S, Shigata S, Suzuki O and Kono. 2003. Production and Acid Phosphatase from a Sake Koji Mold,

- Aspergillus oryzae*. *Jour. Bioscience and Bioengineering*. 95(4): 384-353.
- Graf E, Empson K and Eaton JW. 1987. Phytic Acid. A Natural Antioxidant. *J. Biol. Chem.* 262: 11647-11651.
- Greiner R, Konietzny U and Jany KD. 1993. Purification and Characterization of Two Phytases From *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* 303: 107-113.
- Greiner R, Haller E, Konietzny U and Jany KD. 1997. Purification and Characterization of A Phytase From *Klebsiella Terrigena*. *Arch. Biochem. Biophys.* 341: 201-206.
- Greiner R and Konietzny U. 2006. Phytase for Food Application. *Food Technol. Biotechnol.* 44 (2): 125-140.
- Howson SJ and Davis RJ. 1983. Production of Phytate-Hydrolysing Enzyme by Fungi. *J. Enzyme Microbiol. Technol.* 5: 377-382.
- Irving GCJ and Cosgrove DJ. 1971. Inositol Phosphate Phosphatase of Microbial Origin. Observations on The Nature of The Active Center of A Bacterial (*Pseudomonas* sp.) Phytase. *Austral. J. Biol. Sci.* 24: 1559-1564.
- IUPAC-IUB (Commission on Biochemical Nomenclature). 1977. Nomenclature of phosphorus containing compounds of biochemical importance. *Eur. J. Biochem.* 79: 1-9.
- Kerovuo J. 2000. A Novel Phytase from *Bacillus*: Characterization and Production of Enzyme. *Dissertation of Doctoral at Faculty of Science of the University of Helsinki, Finlandia*.
- Kim YO, Kim HK, Bae KS, Yu JH and Oh TK. 1998. Purification and Properties of a Thermostable Phytase From *Bacillus* sp. Ds11. *Jour. Enzyme Microbiol. Technol.* 22: 2-7.
- Kim HW, Kim YO, Lee JH, Kim KK, Kim YJ. 2003. Isolation and Characterization of a Phytase with Improved Properties from *Citrobacter braakii*. *Biotechnol. Lett.* 25: 1231-1234.
- Kim TW and Lei XG. 2005. An Improved Method for a Rapid Determination of Phytase activity in animal feed. *J. Anim. Sci.* 83: 1062-1067.
- Konietzny U and Greiner R. 2002. Molecular and Catalytic Properties of Phytat Degrading Enzyme (Phytase). *Int. J. Sci. Technol.* 37: 791-812.
- Konietzny U and Greiner R. 2004. Bacterial Phytase: Potential Application, In Vivo Function and Regulation of Its Synthesis. *Braziliat. Jour Microbiol.* 35: 11-18.
- Laboure AM, Gagnon J and Lescure AM. 1983. Purification and Characterization of A Phytase (Myo-Inositol Hexakisphosphate Phosphohydrolase) Accumulated in Maize (*Zea mays*) Seedlings During Germination. *Biochem. J.* 295: 413-419.
- Lan GQ, Abdullah N, Jalaludin S and Ho YW. 2002. Culture Conditions Influencing Phytase Production of *Mitsuokella jalaludinii*, a New Bacterial Species from the Rumen of Cattle. *J. Appl. Microbiol.* 93: 668-674.
- Lan GQ, Abdullah N, Jalaludin S and Ho YW. 2004. Efficacy of Supplementation of Phytase-Producing Bacterial Culture on the Performance and Nutrient Use of Broiler Chickens Feed Corn-Soybean Meal Diets. *Poultry Science.* 81: 1522-1532.
- Liu Z, Wang H, Xiu-E Wang, Xu H, Gao D, Zhang G, Chen P and Liu D. 2007. Effect of Wheat Perling on Flour Phytase Activity, Phytic Acid, Iron and Zinc Content. *Food Sci and Technology, Swiss.*
- Lolas GM and Markakis P. 1977. Phytic Acid and Other Phosphorus Compound Soybeans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Agric. Food. Chem.* 23: 13.
- Marlida Y. 2001. Isolation and Purification of Raw Starch Degrading Enzyme from *Acremonium endophytic* Fungus and Its Application for Glucosa Production. *Dissertation of Doctoral at University Putra Malaysia, Malaysia.*
- Marlida Y. 2003. Penampilan Produksi Ternak Domba Menggunakan Pakan Berserat Tinggi yang Difermentasi dan Disuplementasi dengan Enzim Selulase yang Dihasilkan oleh Kapang Endofitik. Laporan HB. X/II. Padang.
- Martin JA, Murphy RA and Power RFF. 2005. Purification and Physico-Chemical Characterisation of Genetically Modified Phytases Expressed in

- Aspergillus awamori*. Bioresource Technology 97. Irlandia.
- Pallauf J and Rimbach RFF. 1996. Nutritional Significance of Phytic Acid and Phytase. *Arch. Anim. Nutr.* 50: 301-319.
- Pimentel IC, Glienke-blanco C, Gabardo J, Stuard RM and Azevedo JL. 2006. Identification and Colonization of Endophytic Fungi from Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) under Different Environmental Conditions. *Jour Brazilian Archives of Biology and Technilogy.* 45 (5): 705-711.
- Powar VK, and Jagannathan V. 1982. Purification and Properties of Phytate-Specific Phosphatase from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 151: 1102-1108.
- Quan C, Zhang L, Wang Y and Ohta Y. 2001. Production of Phytase in Low Phosphate Medium by a Novel Yeast *Candida krusei*. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 9 (2): 154-160.
- Radji M. 2005. Peranan Bioteknologi dan Mikroba Endofit dalam Pengembangan Obat Herbal. *Majalah Ilmu Kefarmasian.* Desember 2005. 2 (3): 112- 126.
- Reddy NR, Pierson MD, Sathe SK and Salunkhe DK. 1989. Phytates in Cereals and Legumes. Crc Press, Inc., Boca Raton, Fla.
- Rhodes A and Fletcher DL. 1966. *Principles of Industrial Microbiology*. Pergamon Press, New York.
- Samson RA and van Reenen ES-Hoekstra. 1988. *Intoduction to Food-Borne Fungi*. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Wageningen.
- Sandberg AS and Svanberg U. 1991. Phytate Hydrolysis by Phytase in Cereals: Effect on in vitro Estimation of Iron Availability. *Jour. of Food Science.* 56 (5): 1330-1333.
- Scott JJ. 1991. Alkaline Phytase Activity in Nonionic Detergent Extracts of Legume Seeds. *Plant Physiol.* 95, 1298-1301.
- Selle PH, Ravindran V, Cadwell RA and Bryden WL. 2000. Phytate and Phytase: Consequences for Protein Utilisation. *Nutrition Reviews.* 255-278.
- Shieh TR and Ware JH. 1968. Survey of Microorganisms for The Production of Extracellular Phytase. *Appl. Microbiol.* 16: 1348-1351.
- Shah V and Parekh LJ. 1990. Phytase From *Klebsiella* sp. No. Pg-2: Purification and Properties. *Indian J. Biochem. Biophys.* 27: 98-102.
- Shimizu, M. 1992. Purification and Characterization of Phytase From *Bacillus subtilis* (Natto) N-77. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56: 1266-1269
- Shaefer A and Koppe WM. 1995. Effect of Microbial Phytase on Utilization on Native Phosphorus by Carp in a Diet Based on Soybean Meal. *Journ of Water Science Technol.* 31 (1): 159-155.
- Singh M and Krikorian AD. 1982. Inhibiton of Trypsin Activity in vivo by Phytate. *J. Agric. Food Chem.* 30: 799-805.
- Simell M, Turunen M, Piironen J and Vaara T. 1989. *Feed and Food Applications of Phytase*. Lecture At 3rd Meet. Industrial Applications Of Enzymes, Barcelona, Spain.
- Simoes NC and Guggenbuhl P. 1998. Comparative Effect of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus niger* on Phosphorus and Calcium Digestibilities and Phosphorus Faecal Excretion in Growing Pig. *J. Anim. Feed Sci.* 71: 177-180.
- Trudy, McKee. 1999. *Biochemistry: An Intoduction*. Secend Edition. McGraw-Hill. Amerika.
- Stefan H, Anja K, Edzard S, Bijoerg S, Marcus L, Oskar Z. 2005. Biotechnological Production and Application of Phytase. *App. Microbiol Biotech.* 68 (5): 125-140.
- Volfova O, Dvorakova J, Hanzlikova A and Jandera A. 1994. Phytase from *Aspergillus niger*. *Folia Microbiol.* 39: 481-484.
- Vohra A and Satyanarayana T. 2002. Purification and Characterization of Thermostabil and Acid Stable Phytase from *Pichia anomala*. *Jour. Micro and Biotech.* 18: 687-691.
- Wards OP. 1983. *Proteinase*. In: Forgarty WM (ed). *Microbial Enzyme and Biotechnology*. London.
- Walz OP and Pallauf J. 2002. Microbial Phytase Combined with Amino Acid Supplementation Reduced P and N Excretion og Growing and Finishing

- Pig without Loss Performance. *Int. J. Food Sci. Technol.* 37: 835-848.
- Widowati S, Rosmimik S, Andriani D dan Damardjati DS. 1998. Optimalisasi Produksi Phytase dari *Bacillus coagulans* pada Skala Laboratorium. *Makalah* Disampaikan pada Seminar Nasional Bioteknologi di Malang.
- Wodzinski RJ and Ullah AHJ. 1996. Phytase. *Adv. Appl. Microbiol.* 42: 263-303.
- Wyss ML, Pasamontes, Friedlein A, Remy R, Tessier M, Kronenberger A, Middendorf A, Lehmann M, Shnoebelen L, Rothlisberger U, Kuszniir E, Wahl G, Muller F, Lahm HW, Vogel K and Van Loon. 1999. Biophysical Characterization of Fungal Phytases (Myo-Inositol Hexakisphosphate Phosphohydrolases): Molecular Size, Glycosylation Pattern, and Engineering of Proteolytic Resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 359-366.
- Yang WJY, Matsuda S, Sano H, Masutani and Nakagawa. 1991. Purification and Characterization of Phytase From Rat Intestinal Mucosa. *Biochim. Biophys. Acta* 1075: 75-82.
- Yanke LJ, Bae HD, Selinger LB, Cheng KJ. 1998. Phytase Activity of Anaerobic Ruminant Bacteria. *Microbiol.* 144: 1565-1573.
- Yoon SJ, Choi YJ, Min HK, Cho KK, Kim JW, Lee SC and Jung YH. 1996. Isolation and Identification of Phytase-Producing Bacterium, *Enterobacter* sp. 4, and Enzymatic Properties of Phytase Enzyme. *Enzyme Microbiol. Technol.* 18: 449-454.