

**INDUKSI, ISOLASI DAN KARAKTERISASI  
PHYTASE DARI *Bacillus amyloliquefaciens***

**SKRIPSI**

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi syarat-syarat untuk menyelesaikan Program Sarjana (S1) Pendidikan Biologi dan mencapai gelar Sarjana Pendidikan Biologi

Asal :	Hadiah	Klasifikasi
	Pembelian	76-119
Terima Tgl :	28 NOV 2006	SCW
No. Induk :	Oleh :	i
Pengkatalog :		
SUNARMAN		
NIM. 020210103072		

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN BIOLOGI  
JURUSAN PENDIDIKAN MIPA  
FAKULTAS KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2006**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Almamater Program Studi Pendidikan Biologi Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Jember.
2. Ayahanda Sadiman dan Ibunda Satiyem tercinta, berkat Do'a, kasih sayang, pengorbanan dan doronganmu untuk terus maju dan pantang menyerah sehingga ananda dapat menyelesaikan studi, semoga Allah SWT membalas kebaikan Bapak dan Ibu.
3. Maria Ulfa, yang selalu menghiasi hari-hariku dengan kasih sayang, kesabaran, motivasi dan Do'a sehingga aku dapat menyelesaikan skripsiku ini.
4. Keluarga besar di Wonogiri, Pakde, Bude, Paman, Bibi, dan Sepupu-sepupuku terima kasih atas bantuan material dan spiritual yang telah kalian curahkan selama ini.
5. Anak-anak asrama H. Ali Mastrip IV No. 99, Yudho, Fatah, Majid dan Daman terimakasih atas bantuan kalian selama ini.
6. Sahabat-sahabatku seperjuangan di Laboratorium Biologi Molekuler, terutama Novita, Delli dan Didik semoga Allah SWT senantiasa memberikan kekuatan dan keteguhan dalam mencapai cita-cita kalian.
7. Dosen dan guru-guruku, yang telah memberikan ilmu dan membimbing dengan tulus dan penuh kesabaran.

MOTTO

*“dan sesungguhnya pada binatang ternak benar – benar  
terdapat pelajaran bagi kamu”*

*(Terjemahan Q.s. An –Nahl : 5)*

*Seorang yang patuh kepada Allah dan Berbakti kepada  
kedua orang tuanya, maka tempatnya di perumahan  
para iliyun kelas tertinggi.*

*(HR. Ad-Daelami)*

## PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Sunarman

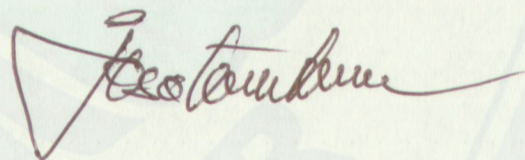
NIM : 020210103072

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya tulis ilmiah yang berjudul: " induksi, Isolasi dan Karakterisasi Phytase dari *Bacillus amyloliquefaciens*" adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika disebutkan sumbernya dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember,

Yang menyatakan,



Nama : Sunarman

NIM : 020210103072

**PENGAJUAN**

Induksi, Isolasi dan Karakterisasi Phytase dari *Bacillus amyloliquefaciens*

**SKRIPSI**

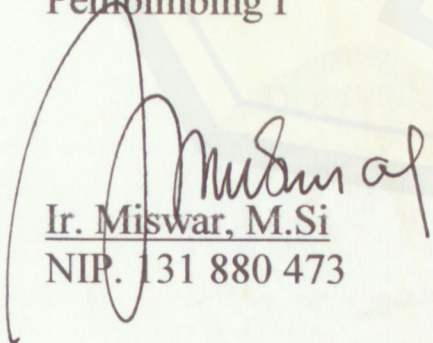
Diajukan untuk dipertahankan di depan tim penguji guna memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Pendidikan Sarjana Strata Satu (S1) pada Program Studi Pendidikan Biologi Jurusan Pendidikan MIPA Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Jember

Oleh:

Nama : Sunarman  
NIM : 020210103072  
Tahun/ angkatan : 2002  
Tempat, tanggal lahir : Wonogiri, 6 Oktober 1982  
Jurusan/ Program : Pendidikan MIPA/Pendidikan Biologi

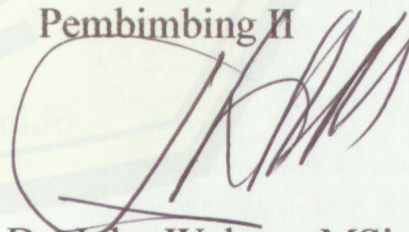
Disetujui Oleh:

Pembimbing I



Ir. Miswar, M.Si  
NIP. 131 880 473

Pembimbing II



Dr. Joko Waluyo, M.Si  
NIP. 131 478 930

**PENGESAHAN**

Skripsi ini diterima oleh Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Jember Pada:

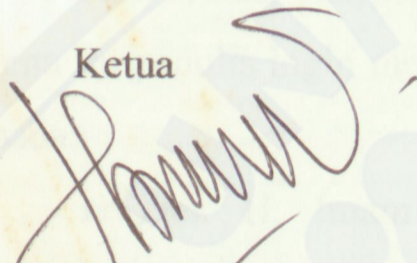
Hari :

Tanggal :

Tempat : Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan  
Universitas Jember

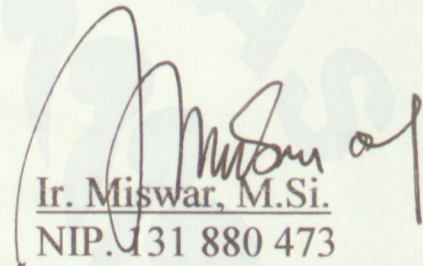
Tim penguji:

Ketua



Dr. Wachju Subchan, MS, Ph.D.  
NIP.132 046 353

Sekretaris



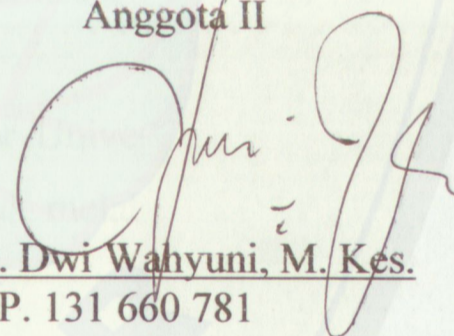
Ir. Miswar, M.Si.  
NIP.131 880 473

Anggota I



Dr. Joko Waluyo, M.Si.  
NIP. 131 478 930

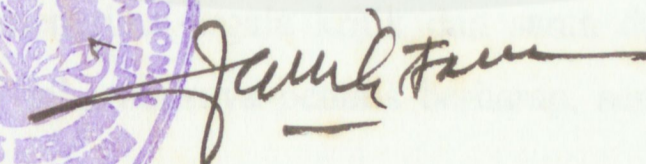
Anggota II



Dr. Dwi Wahyuni, M. Kes.  
NIP. 131 660 781

Mengetahui,

Dekan Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan  
Universitas Jember



Dr. H. Imam Muchtar, S.H., M.Hum  
NIP. 130 810 936

## KATA PENGANTAR

Syukur Allhamdulillah penulis panjatkan ke hadirat Allah Swt atas segala rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan karya tulis ilmiah yang berjudul “Induksi, Isolasi dan Karakterisasi Phytase dari *Bacillus amyloliquefaciens*”. Karya tulis ilmiah ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Program Studi Pendidikan Biologi, Jurusan MIPA, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang tiada terhingga kepada:

1. Drs. H. Imam Muchtar, S.H., M.Hum., selaku Dekan Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Jember;
2. Ir. Imam Mudakir, M.Si., sebagai Ketua Jurusan Pendidikan MIPA FKIP Universitas Jember;
3. Drs. Suratno, M.Si., sebagai Ketua Program Studi Pendidikan Biologi FKIP Universitas Jember;
4. Kepala Pusat Penelitian Biologi Molekuler Universitas Jember yang telah memberikan ijin kepada penulis untuk melaksanakan penelitian di Laboratorium Biologi Molekuler.
5. Ir. Miswar, M.Si., selaku Dosen Pembimbing I, dan Dr. Joko Waluyo, M.Si., selaku Dosen Pembimbing II yang telah meluangkan waktu dan pikiran serta perhatiannya guna memberikan bimbingan dan pengarahan demi terselesaikannya skripsi ini.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga tulisan ini dapat bermanfaat.

Jember, September 2006

Penulis

## RINGKASAN

**Induksi, Isolasi dan Karakterisasi Phytase dari *Bacillus amyloliquefaciens*, 2006, 46 hlm.**

Asam fitat (*myo-inositol hexaphosphate*) merupakan bentuk mineral phosphor yang tersimpan dalam tanaman (khususnya pada biji sereal dan legum) dapat mengikat mineral ( $P$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^+$ ,  $Ca^+$ ), protein dan asam amino sehingga sulit diserap oleh hewan non ruminansia dan manusia. Phytase (*myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase*) mampu menghidrolisis asam fitat menjadi phosphat anorganik dan myo-inositol. Pemanfaatan phytase dalam menurunkan kadar asam fitat dalam bahan makanan dapat meningkatkan daya serap usus terhadap mineral, protein dan asam amino. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas dan karakter phytase yang dihasilkan oleh *Bacillus amyloliquefaciens* dengan menggunakan media cair, serta untuk mengetahui kemampuan phytase yang dihasilkan dalam menghidrolisis asam fitat yang terdapat pada bahan pangan dan pakan.

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan April – September 2006 di Laboratorium Pusat Penelitian Biologi Molekuler Universitas Jember, dengan menggunakan analisis deskriptif. Langkah-langkah yang dilakukan dalam penelitian meliputi: pembuatan komposisi media cair, isolasi phytase dari *bacillus amyloliquefaciens*, purifikasi dengan menggunakan dialisis dan DEAE-cellulosa, pengukuran aktivitas phytase, pengukuran kandungan protein terlarut, karakterisasi phytase (suhu optimum, pH optimum,  $K_m$  dan  $V_{maks}$ ) dan uji kemampuan hidrolisis phytase terhadap asam fitat dalam bahan pangan dan pakan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas phytase yang dihasilkan oleh *Bacillus amyloliquefaciens* sebesar 182.400  $\mu gPi/jam/mg$  protein, dengan tingkat kemurnian (*fold*) 23.893 kali. Phytase dari *Bacillus amyloliquefaciens* memiliki aktivitas optimum pada suhu  $70^{\circ}C$  dan pH 5,0, dengan nilai  $K_m$  sebesar 1.189 mM asam fitat dan  $V_{maks}$  sebesar 111.11  $\mu gPi/jam$ . Aktivitas spesifik phytase dalam menghidrolisis asam fitat yang terdapat dalam tepung kedelai



sebesar 352.8  $\mu\text{gPi}/\text{jam}/\text{mg}$  protein dan pada tepung jagung sebesar 558  $\mu\text{gPi}/\text{jam}/\text{mg}$  protein.

Kesimpulan yang didapat dari hasil dan pembahasan adalah phytase *Bacillus amyloliquefaciens* memiliki Aktivitas spesifik 182.400  $\mu\text{gPi}/\text{jam}/\text{mg}$  protein dan memiliki karakteristik pada suhu optimum 70<sup>0</sup>C dan pH optimum 5,0, Km sebesar 1.189 mM dan Vmaks sebesar 111.11  $\mu\text{gPi}/\text{jam}$ . Enzim ini mempunyai kemampuan dalam menghidrolisis asam fitat yang terdapat dalam tepung kedelai sebesar 352.8  $\mu\text{gPi}/\text{jam}/\text{mg}$  protein dan pada tepung jagung sebesar 558  $\mu\text{gPi}/\text{jam}/\text{mg}$  protein.

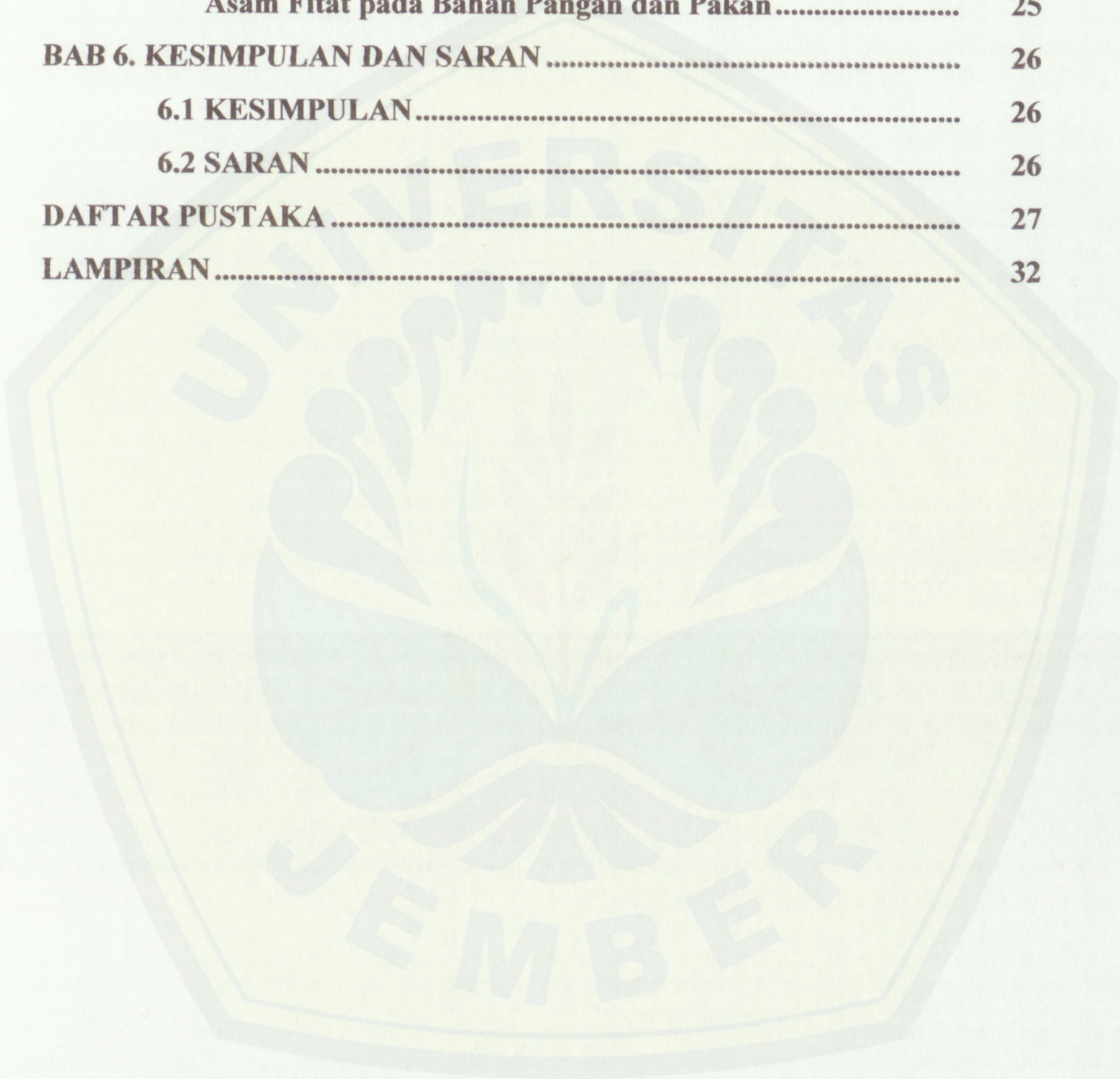
Jurusan Pendidikan MIPA, Program Studi Pendidikan Biologi, Fakultas Keguruan Dan Ilmu Pendidikan, Universitas Jember.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	ii
HALAMAN MOTTO.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PENGAJUAN .....	v
HALAMAN PENGESAHAN .....	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
RINGKASAN.....	viii
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR .....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN .....	xv
<b>BAB 1. PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Latar Belakang .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Rumusan Masalah.....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Batasan Masalah.....</b>	<b>3</b>
<b>1.4 Tujuan Penelitian .....</b>	<b>3</b>
<b>1.5 Manfaat Penelitian .....</b>	<b>3</b>
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Asam Fitat (<i>Phytic acid</i>) .....</b>	<b>4</b>
<b>2.2 Phytase.....</b>	<b>5</b>
<b>2.3 Manfaat Phytase .....</b>	<b>7</b>
<b>2.4 Gambaran Umum <i>Bacillus</i> .....</b>	<b>7</b>
<b>2.5 Klasifikasi <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> .....</b>	<b>8</b>
<b>2.6 Aktivitas Phytase <i>Bacillus</i>.....</b>	<b>9</b>
<b>2.7 Purifikasi Phytase.....</b>	<b>9</b>

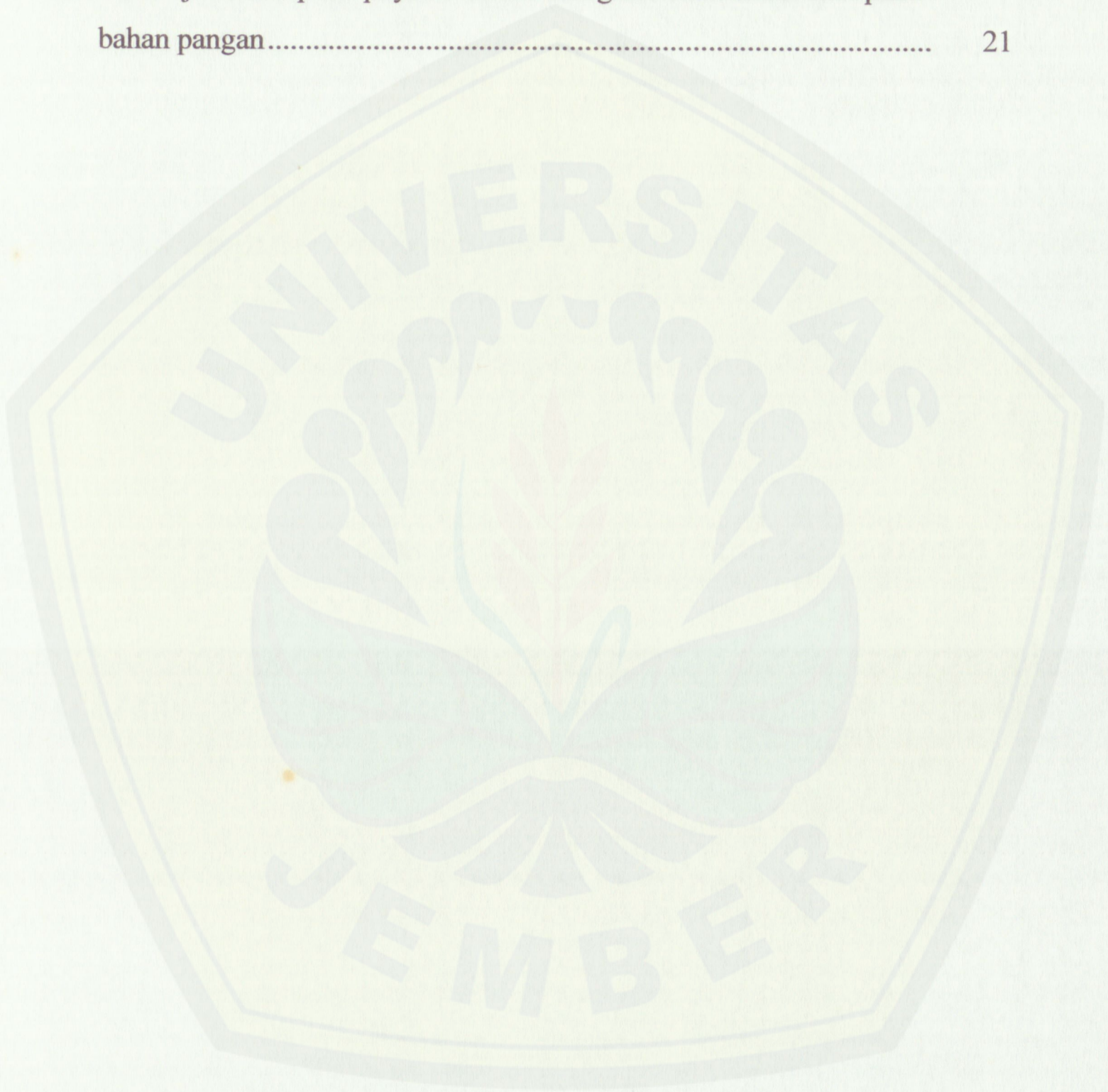
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>11</b>
<b>3.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....</b>	<b>11</b>
<b>3.2 Definisi Operasional Variabel .....</b>	<b>11</b>
3.2.1 Induksi .....	11
3.2.2 Isolasi.....	11
3.2.3 Karakterisasi .....	11
<b>3.3 Alat dan Bahan Penelitian .....</b>	<b>12</b>
3.3.1 Alat .....	12
3.3.2 Bahan.....	12
<b>3.4 Metode Penelitian .....</b>	<b>12</b>
3.4.1 Induksi <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> .....	12
3.4.2 Isolasi phytase ekstrak kasar ( <i>crude extract</i> ) .....	12
3.4.3 Purifikasi phytase .....	13
3.4.4 Penentuan aktivitas phytase.....	13
3.4.5 Pengukuran kandungan protein terlarut .....	14
3.4.6 Karakterisasi phytase.....	14
3.4.6.1 Karakterisasi suhu .....	14
3.4.6.2 Karakterisasi pH.....	14
3.4.6.3 karakterisasi Km dan Vmaks .....	14
3.4.7 Uji kemampuan hidrolisis phytase terhadap asam fitat dalam bahan pangan dan pakan .....	15
<b>3.5 Diagram Prosedur Kerja Penelitian .....</b>	<b>16</b>
<b>BAB 4. HASIL PENELITIAN .....</b>	<b>18</b>
<b>4.1 Komposisi Media Cair .....</b>	<b>18</b>
<b>4.2 Purifikasi phytase.....</b>	<b>18</b>
<b>4.3 Karakterisasi Phytase .....</b>	<b>19</b>
<b>4.4 Hasil Uji Kemampuan Phytase dalam Menghidrolisis         Asam Fitat pada Bahan Pangan dan Pakan .....</b>	<b>21</b>

<b>BAB 5. PEMBAHASAN .....</b>	<b>22</b>
<b>5.1 Komposisi Media Cair .....</b>	<b>22</b>
<b>5.2 Purifikasi Phytase.....</b>	<b>22</b>
<b>5.3 Karakterisasi Phytase .....</b>	<b>23</b>
<b>5.4 Uji Kemampuan Phytase dalam Menghidrolisis         Asam Fitat pada Bahan Pangan dan Pakan .....</b>	<b>25</b>
<b>BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>26</b>
<b>6.1 KESIMPULAN.....</b>	<b>26</b>
<b>6.2 SARAN .....</b>	<b>26</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>27</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>32</b>



**DAFTAR TABEL**

	Halaman
4.1 Aktivitas spesifik phytase hasil purifikasi (pemurnian).....	19
4.2 Hasil uji kemampuan phytase dalam menghidrolisis asam fitat pada bahan pangan.....	21



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Gambar struktur umum asam fitat yang mengikat 6 ion fosfat....	4
2.2 Gambar prinsip kerja dialisis.....	10
2.3 Pengikatan protein yang berikatan DEAE-celulosa yang bermuatan positif.....	10
4.1 Grafik pengaruh media terhadap aktivitas (ABS 690) phytase <i>Bacillus amyloliquifaciens</i> .....	18
4.2 Grafik pengaruh suhu terhadap aktivitas phytase <i>Bacillus amyloliquifaciens</i> .....	19
4.3 Grafik pengaruh pH terhadap aktivitas phytase <i>Bacillus amyloliquifaciens</i> .....	20
4.3 Grafik kurva hubungan antara $[1/s]$ dengan $1/v$ .....	21

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Matrik penelitian .....	31
B. Kurva standart protein .....	32
C. Kurva standart Pi .....	33
D. Pengaruh media terhadap aktivitas (ABS 690) phytase <i>Bacillus amyloliquifaciens</i> .....	34
E. Hasil dan perhitungan kandungan protein.....	35
F. Kandungan protein dan aktivitas phytase <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> hasil fraksinasi. ....	36
G. Hasil dan perhitungan uji aktivitas.....	38
H. Hasil dan perhitungan karakterisasi suhu.....	39
I. Hasil dan perhitungan karakterisasi pH.....	41
J. Karakterisasi Vm dan Km .....	43
K. Hasil Uji Kemampuan Hidrolisis Phytase Terhadap Asam Fitat dalam Bahan Pangan dan Pakan.....	45
L. Foto Penelitian .....	47



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Biji tanaman sereal, legum dan *oilseed plant* banyak digunakan sebagai sumber nutrisi yang penting bagi manusia dan hewan. Selain sebagai sumber karbohidrat, protein dan lemak biji-bijian tersebut juga sebagai sumber mineral yang penting bagi pertumbuhan seperti P, Ca, Fe, dan Ze (Morris, 1986).

Hal yang perlu diperhatikan dari biji-bijian ini adalah kandungan asam fitat (mio-inositol heksakiphosphate). Asam fitat dalam bentuk garam fitat merupakan bentuk simpanan unsur phosphor (P) yang dapat mencapai 80% dari P total dalam biji legum dan sereal (Reddy, 1989). Dalam kondisi fisiologis normal asam fitat membentuk *chellate* dengan mineral-mineral essensial seperti kalsium, magnesium, besi dan seng. Asam fitat sering kali berikatan dengan asam-asam amino dan protein dan menghambat enzim-enzim pencernaan (Pallaup and Rimback, 1996), selain itu asam fitat juga dapat mengikat enzim seperti amilase, tripsin, pepsin dan  $\beta$ -galaktosidase sehingga menurunkan aktivitasnya. Adanya asam fitat juga menjadikan beberapa mineral dan protein menjadi tidak larut sehingga tidak dapat diserap oleh usus manusia dan ternak non ruminansia (Liu, *et al.*, 1997). Asam fitat dianggap sebagai senyawa anti nutrisi pada bahan pangan maupun pakan. Tingginya konsumsi produk dari biji-bijian sereal dan legum oleh manusia dan ternak non ruminansia dapat memberikan sumbangan pada pencemaran lingkungan (Viveros *et al.*, 2000), hal ini dikarenakan unsur P yang terikat pada asam fitat tidak dapat diserap dan terbuang bersama feces sehingga mencemari lingkungan. Untuk mengatasi dampak negatif dari asam fitat ini diperlukan enzim yang dapat menghidrolisis asam fitat tersebut.

Phytase (mio-inositol heksakiphosphate phosphohidrolase, EC (3. 1. 3. 8) merupakan suatu phosphomonoesterase yang mampu menghidrolisis asam fitat menjadi ortofosfat anorganik dan ester-ester phosphat dari mio-inositol yang lebih rendah. Pada kondisi tertentu bahkan menjadi phosphat dan mio-inositol bebas (Cosgrove, 1980). Phytase dapat dihasilkan oleh tumbuh-tumbuhan, mikroorganisme dan juga jaringan ternak.



Phytase dalam bahan makanan tidak stabil, sehingga tidak dapat diharapkan sebagai sumber enzim. Distribusi phytase dalam tanaman tidak seimbang dengan kandungan fitatnya dan ada kemungkinan aktivitas enzim phytase dihambat oleh kandungan fitat yang lebih tinggi. Aktivitas phytase pada mikroorganisme terutama ditemukan pada kapang khususnya *Aspergillus* sp. Menurut Shieh and Ware (1998) aktivitas phytase ekstraseluler yang tinggi ditemukan pada *Aspergillus niger* dan *Aspergillus ficuum*. Phytase juga dihasilkan oleh bakteri *Pseudomonas* sp (Irving and Cosgrove, 1971).

Phytase dari beberapa *Bacillus* dan *Enterobacter* memiliki pH optimum yang berkisar dari 6-8, oleh karena itu phytase dari spesies ini akan bermanfaat menjadi bahan tambahan pakan ternak karena pH optimumnya mendekati pH fisik dari *poultry crop* (Ursula and Greiner, 2004). Phytase dari *Bacillus amyloliquefaciens* memiliki suhu optimum pada suhu 70<sup>0</sup>C (Kim *et al.*, 1998). Menurut Sangadji (2004) phytase yang memiliki potensi untuk dikembangkan secara komersial adalah phytase yang mampu aktif pada suhu ekstrim sehingga mampu mempertahankan aktivitasnya pada saat proses *pelleting*.

Berdasarkan uraian di atas maka peneliti bermaksud mengadakan penelitian dengan judul **“induksi, isolasi dan karakterisasi phytase dari *Bacillus amyloliquefaciens*”**

## 1.2 Rumusan Masalah

Dalam penelitian ini bakteri *Bacillus amyloliquefaciens* akan diinduksi untuk menghasilkan phytase. Permasalahan yang akan diteliti dalam penelitian ini antara lain.

- 1) Apakah bakteri *Bacillus amyloliquefaciens* mampu menghasilkan enzim phytase?
- 2) Bagaimana karakter phytase yang dihasilkan oleh bakteri *Bacillus amyloliquefaciens*?
- 3) Bagaimana kemampuan phytase yang dihasilkan dalam menghidrolisis asam fitat yang terdapat dalam bahan pangan dan pakan?

### 1.3 Batasan Masalah

Penelitian ini terbatas pada produksi phytase ekstraseluler dari *Bacillus amyloliquefaciens* koleksi *Food and Nutrition Colection Culture* UGM Yogyakarta (FNCC) yang ditumbuhkan pada media cair yang terdiri dari tepung gandum,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , Casein hydrolase, KCL,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , dan  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  pH diatur sampai 7,0. Karakter phytase hasil purifikasi yang akan diuji meliputi suhu dan pH optimum reaksi, nilai  $V_{\text{maks}}$  dan  $K_m$  pada suhu dan pH optimum.

### 1.4 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut.

- 1) Untuk menghasilkan phytase dari *Bacillus amyloliquefaciens*.
- 2) Untuk mengetahui karakter phytase yang dihasilkan dalam menghidrolisis asam fitat.
- 3) Untuk mengetahui kemampuan phytase yang dihasilkan dalam menghidrolisis asam fitat yang terdapat dalam bahan pangan dan pakan.

### 1.5 Manfaat Penelitian

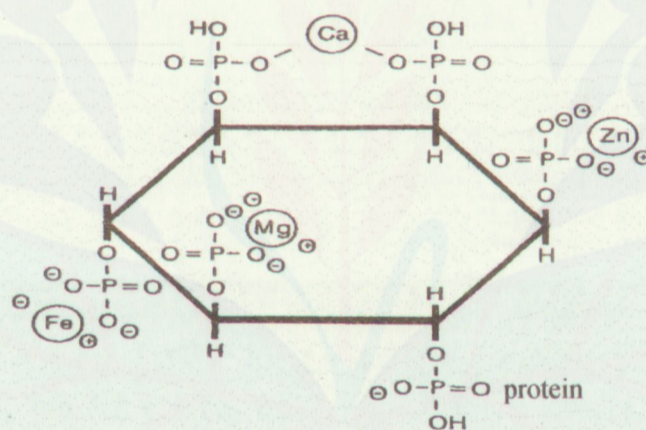
Adapun manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut.

- 1) Manfaat bagi peneliti, dapat menambah ilmu pengetahuan, khususnya sebagai dasar pengembangan teknologi enzim yang berasal dari bakteri.
- 2) Manfaat bagi instansi, dapat memberikan informasi yang berharga tentang pengembangan teknologi enzim yang berasal dari bakteri dalam industri bahan pangan dan pakan.
- 3) Manfaat bagi masyarakat, dengan penggunaan phytase pada bahan pangan dan pakan dapat meningkatkan nilai gizi pada bahan pangan ataupun pakan yang berasal dari biji sereal dan legum, serta dapat mengurangi pencemaran lingkungan.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Asam Fitat (*Phytic acid*)

Industri makanan baik untuk manusia (pangan) maupun untuk ternak (pakan) banyak menggunakan biji-bijian sereal dan legum sebagai bahan utamanya. Pada industri makanan ternak penggunaan kedelai dan jagung khususnya pakan ayam sangat dominan. Selain itu juga pada industri pangan instan untuk bayi dan anak-anak banyak menggunakan biji-bijian sereal dan legum. Pada kedua jenis biji tersebut banyak mengandung asam fitat (*myo-inositol hexaphosphate*). Asam fitat merupakan bentuk mineral phosphor tersimpan dalam tanaman, khususnya pada biji sereal dan legum (Wilcox *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2003). Secara umum struktur asam fitat (*phytic acid*) adalah sebagai berikut :



Gambar 2.1 Struktur umum asam fitat yang mengikat 6 ion phosphate (Kerovuo, 2000).

Secara alami asam fitat membentuk kompleks dengan beberapa mineral (P, Zn, Fe, Mg, Ca), protein dan asam amino (Nagashima *et al.*, 1999; Wyss *et al.*, 1999; Kerovuo, 2000; Quan *et al.*, 2001) yang menyebabkan tidak dapat diserap oleh usus manusia dan ternak non ruminansia (Bergman *et al.*, 2000 ). Dari segi nutrisi, asam fitat merupakan senyawa faktor anti-nutrisi (*antinutrient factor*) yang mengakibatkan rendahnya **nilai nutrisi** (*nutritive value*) suatu bahan makanan, khususnya sereal dan legum. Kandungan asam fitat tertinggi diantara tanaman sereal adalah jagung (0,83-2,22%), sedangkan diantara tanaman legum adalah kacang koro (5,92-9,15%) (Reddy *et al.*, 1989).

Pada pakan ternak unggas khususnya ayam, pemakaian kedelai sebagai penyusun pakannya dapat mencapai 50% (Hegeman and Grabau, 2001) demikian pula penggunaan jagung. Ketidakmampuan ternak non ruminansia dan manusia untuk menyerap unsur-unsur nutrisi yang terikat pada asam fitat biji sereal dan legum karena kandungan enzim phytase dalam ususnya sangat rendah (Quan *et al.*, 2001; Wyss *et al.*, 1999). Unsur P yang tidak dapat dicerna akan diekskresikan bersama feces dan menyebabkan pencemaran lingkungan pada daerah yang banyak usaha peternakannya (Viveros *et al.*, 2000). Terjadinya akumulasi fosfat yang tinggi pada suatu daerah dapat mencemari badan air (Berka *et al.*, 1998). Di beberapa negara seperti Belanda, Jerman, Korea dan Taiwan telah diberlakukan peraturan untuk mengurangi polusi phosphor yang dihasilkan oleh usaha peternakan (Wodzinski and Ullah, 1996).

## 2.2 Phytase (*Phytase enzymes*)

Enzim phytase (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase) merupakan kelompok enzim phosphate yang mampu menghidrolisis asam fitat menjadi monophosphate anorganik dan myo-inositol phosphate rendah (*lower myo-inositol phosphate*), bahkan dalam kasus tertentu dapat menghasilkan myo-inositol bebas (Kerovuo, 2000; Quan *et al.*, 2002). Sejauh ini ada dua macam enzim phytase yang telah diketahui yaitu 3-phytase (EC 3.1.3.8) dan 6-phytase (EC 3.1.3.26) yang memutus phosphate pertama kali masing-masing pada atom nomor 3 dan 6 (Quan *et al.*, 2002). Lebih lanjut dijelaskan enzim 3-phytase umumnya dihasilkan oleh mikrobia, sedangkan 6-phytase dihasilkan oleh tanaman. Suhu optimal phytase asal sereal adalah 45<sup>0</sup>C sampai 57<sup>0</sup>C. Phytase asal tumbuhan memiliki pH optimum antara 4,8 – 5,6. Aktivitas phytase asal tumbuhan bervariasi dipengaruhi oleh *cultivar*, umur dan kondisi penyimpanan (Liu *et al.*, 1998). Temperatur tinggi yaitu 70<sup>0</sup>C –80<sup>0</sup>C akan menyebabkan sebagian atau seluruh enzim tidak aktif (Pallauf and Rimbach, 1996).

Peran enzim ini sebagai makanan tambahan (*food* atau *feed additive*) untuk mengurangi kandungan asam fitat pada makanan manusia dan ternak telah lama digunakan (Quan *et al.*, 2002; Nagashima *et al.*, 1999). Penggunaan enzim

phytase pada kalkun yang diberi pakan dari jagung dan kedelai dapat meningkatkan pertumbuhan ayam, pencernaan N, asam amino dan penggunaan unsur phosphor. Penambahan enzim phytase sebagai *feed additive* untuk pakan babi dan ayam dapat meningkatkan ketersediaan phosphor, dan mengurangi sekitar 30-40% polusi lingkungan oleh phosphate

Enzim phytase dapat dihasilkan oleh beberapa organisme termasuk jamur, yeast, bakteri, tanaman dan hewan. Jamur genus *Aspergillus* dilaporkan banyak yang mampu menghasilkan enzim phytase ekstraselular (Kerovuo, 2000). *Aspergillus niger* bersifat aerobik sehingga dalam pertumbuhannya memerlukan oksigen dalam jumlah yang cukup banyak dan pada kisaran pH 2,8-8,8 sedangkan temperatur optimum bagi pertumbuhannya adalah 37<sup>0</sup>C. Beberapa bakteri genus *Bacillus* seperti *B. subtilis* (Powar and Jagannathan, 1982), *B. subtilis* (natto) (Shimizu, 1992) dan *B. amyloliquefaciens* (Kim *et al.*, 1998) juga mampu menghasilkan enzim phytase ekstraselular. Beberapa yeast yang dapat menghasilkan enzim phytase antara lain *Candida krusei* (Quan *et al.*, 2002), *Saccharomyces cerevisiae* dan *Schwanniomyces castelli* (Nakamura *et al.*, 2000).

Suhu dan pH enzim tergantung dari jenis dan sumber enzimnya. Beberapa pH dan suhu optimum phytase dari berbagai mikroba telah dilaporkan. Mikio (1992) mendapatkan phytase dari *B. Subtilis* (natto) N-77 suhu 60<sup>0</sup>C dan pH 6,0-6,5, sedangkan dari *Enterobacter* sp. pH 7,5, suhu 50<sup>0</sup>C. Phytase juga diproduksi oleh *Aspergillus niger* (suhu 58<sup>0</sup>C, pH 5,5), *Schwanniomyces castellii* (suhu 7,7<sup>0</sup>C, pH 4,4), dan *Klebssiella aerogenes* (suhu 45<sup>0</sup>C, pH 7,0)..

Beberapa phytase dari *Bacillus* dan *Enterobacter* memiliki pH optimum yang berkisar 6-8, oleh karena itu phytase ini akan bermanfaat menjadi bahan tambahan pakan ternak karena pH optimumnya mendekati pH fisik *poultry crop* (Ursula and Greiner, 2004).

### 2.3 Manfaat Phytase

Phytase di masa yang akan datang, kemungkinan akan sangat banyak dimanfaatkan untuk industri pakan dan pangan terutama untuk tujuan peningkatan nilai gizi yang terdapat pada makanan (Mahajan and Dua, 1997). Hal ini disebabkan phytase mampu menghancurkan asam fitat sebagai faktor anti-nutrisi pada bahan pangan dan pakan sehingga meningkatkan nilai nutrisinya.

Menurut Berka *et al.* (1998) phytase mempunyai nilai komersial jika diaplikasikan dalam penggunaan kacang kedelai dan biji kapas pada pakan hewan ternak dan digunakan dalam mereduksi asam fitat pada susu kedelai dan susu formula bayi.

### 2.4 Gambaran umum *Bacillus*

*Bacillus* merupakan bakteri berbentuk batang, memiliki endospora, dan merupakan satu-satunya bakteri yang aerob. *Bacillus* merupakan anggota genus gram positif yang memiliki habitat di alam (tanah, air, airborne) beberapa organisme hidup di dalam saluran pencernaan manusia ([www.lp.itb.ac.id](http://www.lp.itb.ac.id)). Kebanyakan jenis dari *Bacillus* adalah mesophilik dan tumbuh dengan baik dan akan memproduksi ukuran koloni yang baik dalam waktu 24 jam jika tumbuh pada suhu 37<sup>0</sup>C. Spesies thermophilus tumbuh pada suhu antara 55-70<sup>0</sup>C biasanya 60<sup>0</sup>C. Spesies yang mesophilus seperti *B. coagulans* akan tumbuh dengan baik pada suhu 45-50<sup>0</sup>C (John and Sons, 1990).

Genus *Bacillus* dapat diisolasi dari tanah atau partikel-partikel debu di udara dan diantara banyak mikrob yang umum tampak ketika partikel tanah distreak pada medium plate agar yang berisi variasi nutrien. Spora-spora tersebut dapat diseleksi, diisolasi dari tanah, makanan atau material lain dengan memperlakukan sampel pada suhu 80<sup>0</sup>C selama 10 menit. Perlakuan yang efektif dapat merusak sel-sel vegetatif, tetapi spora-spora tersebut masih hidup. Setelah dipasteriusasi sedemikian rupa sampel diinkubasi pada kondisi anaerob, koloni yang berkembang hampir hanya genus *Bacillus*.

*Bacillus* biasanya tumbuh baik pada media sintetik yang berisi gula, asam organik, alkohol dan lain-lain sebagai sumber karbon dan amonium sebagai sumber nitrogen. Beberapa isolat memerlukan vitamin.

Anggota genus *Bacillus* telah banyak digunakan sebagai sumber kepentingan industri, saat ini produk utama yang penting dari genus ini adalah hidrolitik enzim, antibiotik, insektisida dan biochemical. Beberapa *Bacillus* memproduksi enzim hidrolitik ekstraseluler yang merusak polisakarida. Asam nukleat dan lemak dapat digunakan oleh mikroba ini sebagai sumber karbon atau donor elektron. Beberapa *Bacillus* memproduksi antimikroba yang diantaranya bacitracin, polymycin, tirocidin, gramicidin, dan circulicin. Produksi antimikroba diproduksi ketika kultur memasuki fase pertumbuhan stasioner dan setelah itu melakukan sporulasi.

Metode tradisional yang digunakan untuk mengidentifikasi spesies *Bacillus* adalah morfologi sporanya. Berdasarkan bentuk sporanya *Bacillus* dikelompokkan menjadi 3 kelompok.

- 1) *Bacillus* dengan bentuk spora oval.
- 2) *Bacillus* dengan spora oval yang memiliki diameter besar dari sporangiumnya.
- 3) *Bacillus* dengan spora seperti bola (John and Sons, 1990).

## 2.5 Klasifikasi *Bacillus amyloliquefaciens*

Menurut Cohn (1872) kedudukan klasifikasi *Bacillus amyloliquefaciens* adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Bacteria
Divisio	: Firmicutes
Kelas	: Bacilli
Ordo	: Bacillales
Famili	: Bacillaceae
Genus	: Bacillus
Spesies	: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>

## 2.6 Aktivitas phytase dalam *Bacillus*

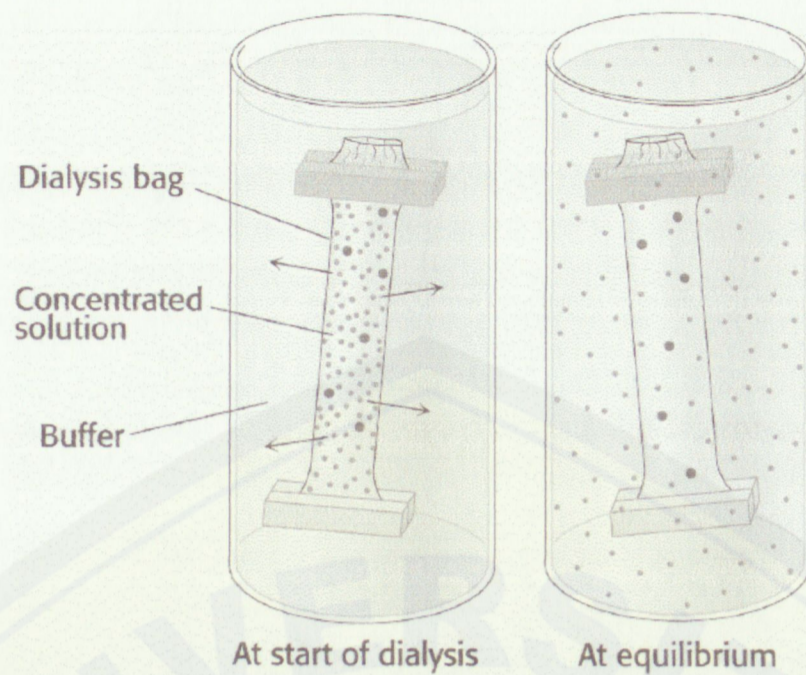
Suhu dan pH enzim tergantung dari jenis dan sumber enzimnya. Beberapa pH dan suhu optimum phytase dari berbagai mikroba telah dilaporkan. Mikio (1992) mendapatkan phytase dari *B. Subtilis* (natto) N-77 suhu 60<sup>0</sup>C dan pH 6,0-6,5. Phytase dari *Bacillus amyloliquefaciens* optimal pada suhu 70<sup>0</sup>C (Kim *et al.*, 1998). Beberapa phytase dari *Bacillus* dan *Enterobacter* memiliki pH optimum yang berkisar 6-8, oleh karena itu phytase ini akan bermanfaat menjadi bahan tambahan pakan ternak karena pH optimumnya mendekati pH fisik *poultry crop* ( Ursula and Ralf, 2004)

## 2.7 Purifikasi Phytase

Purifikasi phytase adalah suatu metode mengisolasi atau memurnikan phytase yang terdapat dalam *Bacillus amyloliquefaciens*. Tahapan-tahapan purifikasi meliputi presipitasi dengan ammonium sulfat, dialisis dan pemisahan dengan kromatografi DEAE-celulosa. Prepsipitasi dengan ammonium sulfat bertujuan untuk mengendapkan garam-garam atau protein yang lain (selain phytase).

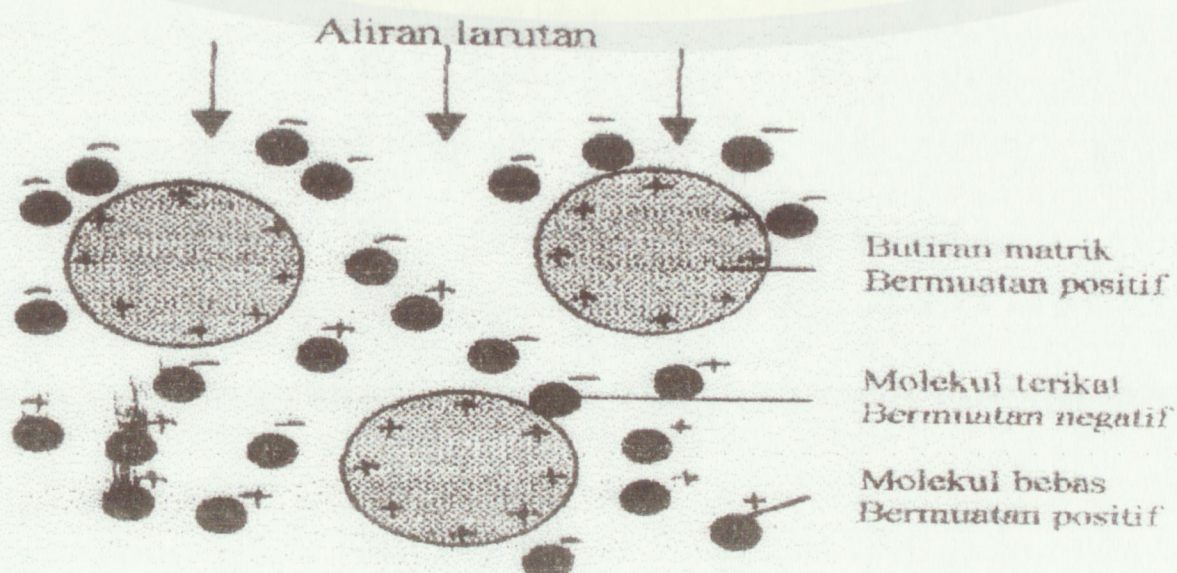
Dialisis merupakan proses difusi selektif yang melewati membran selofan. Proses ini bertujuan untuk menghilangkan garam dan zat terlarut lainnya. Pada proses dialisis ini digunakan selaput semipermeabel. Pergerakan ion-ion dan molekul – molekul kecil melalui selaput semipermeabel disebut dialisis. Suatu koloid biasanya bercampur dengan ion-ion pengganggu, karena partikel koloid memiliki sifat mengadsorbsi. Pemisahan ion pengganggu dapat dilakukan dengan memasukkan koloid ke dalam kertas atau membran semipermeabel (selofan), baru kemudian akan dialiri air yang mengalir. Karena diameter ion pengganggu jauh lebih kecil daripada koloid, ion pengganggu akan merembes melewati pori-pori kertas selofan, sedangkan partikel koloid akan tertinggal. Prinsip kerja dialisis dapat dilihat pada gambar 2.2.





Gambar 2.2 prinsip kerja dialisis.

Pemisahan protein dengan proteolitik perrotein enzimnya tetap aktif sangat sulit, oleh karena itu memerlukan teknik operasi khusus yaitu menggunakan teknik *ion exchanger* (Rossomando, 1990). Berhubungan dengan prinsip kerja ion exchanger, Bruce (1989) mengemukakan bahwa dalam kromatografi ion exchanger matrik yang dapat larut membawa muatan ion yang memperlambat molekul-molekul yang muatannya berlawanan. Matrik yang biasanya memisahkan protein adalah DEAE-celulosa yang bermuatan positif. Protein dimasukan ke dalam kolom lewat atas, maka protein yang bermuatan negatif akan terikat sedangkan yang bermuatan positif akan keluar bersama dengan elusi buffernya. Elusi dengan buffer NaCl yang berkelanjutan akan menggantikan protein yang terikat DEAE-celulosa. Penampungan protein tersebut dilakukan dengan fraksinasi kolektor (Iglesias and Andreo, 1989). Prinsip kerja ion exchanger dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3. Pengikatan protein yang berikatan DEAE-celulosa yang bermuatan positif.



## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Pusat Penelitian Biologi Molekuler Universitas Jember pada bulan April – September 2006.

### 3.2 Definisi Operasional

Definisi operasional variabel ini bertujuan untuk memperjelas gambaran tentang variabel-variabel yang digunakan dalam penelitian ini. Adapun variabel tersebut adalah:

#### 3.2.1 Induksi

Induksi adalah memperlakukan bakteri pada media yang miskin nutrisi sehingga memaksa bakteri tersebut menghasilkan phytase untuk menghidrolisis asam fitat sehingga dilepaskan ion phosphate.

#### 3.2.2 Isolasi

Isolasi phytase adalah suatu proses pemanenan (pemisahan) phytase hasil induksi *Bacillus amyloliquefaciens* pada media cair.

#### 3.2.3 Purifikasi phytase

Purifikasi phytase merupakan proses pemurnian phytase melalui tahap presipitasi, dialisis dan pemurnian dengan kolom kromatografi DEAE-celulosa.

#### 3.2.4 Karakter enzim

Dalam menentukan karakter enzim menggunakan beberapa parameter. Parameter yang diamati meliputi.

- 1) Suhu reaksi optimum: Kemampuan phytase untuk menghidrolisis asam fitat pada suhu tertentu.
- 2) pH reaksi optimum: Kemampuan phytase dalam menghidrolisis asam fitat pada pH tertentu.
- 3) Nilai  $V_{maks}$  dan  $K_m$ : Konsentrasi substrat (asam fitat) tertentu yang menghasilkan kecepatan reaksi maksimum.

### 3.3 Alat dan Bahan

#### 3.3.1 Alat

Pada penelitian ini alat yang digunakan yaitu: tabung reaksi, gelas ukur, beaker glass, erlenmeyer (250 ml, 2000 ml), pipet volume dan pompa volume, lampu busen, mikropipet Gilson + tip (10, 100, 1000  $\mu$ l), neraca analitik Ohaus, autoclave Yamato sterilizer SM 300, shaker inkubator, water bath, vortex, *laminar air flow*, oven Heraeus, defegrated high speed centrifuge sorval RC 5B plus, stirrer TR-300, pH meter Horiba, mikropipet, spektrofotometer (Hitachi Uvi/Visible) membran dialisis, fraksinasi dan kolom kromatografi DEAE-celulose

#### 3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: Bakteri *Bacillus amyloliquefaciens* didapat dari *Food and Nutrition Colection culture* UGM Yogyakarta (FNCC). Media fermentasi cair menggunakan tepung gandum, koro, jagung dan kedelai,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , Casein hydrolase, KCL,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , dan  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Uji aktivitas phytase memerlukan 100 mM buffer sodium asetat (pH 5,0), 15% *Trichloro Acetic Acid* (TCA), *colour reagent* yang terdiri dari 6 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 2,5% ammonium heptamolibdat, 10% asam askorbat, dan  $\text{H}_2\text{O}$ . Uji hidrolisis bahan yang digunakan adalah tepung jagung dan tepung kedelai. Uji kandungan protein memerlukan Reagen Bradford dan standart *Bovine Serum Albumin* (BSA).

### 3.4 Metode Penelitian

#### 3.4.1 Induksi *Bacillus amyloliquefaciens* untuk menghasilkan phytase

Bakteri *Bacillus amyloliquefaciens* ditumbuhkan pada media yang mengandung asam fitat tepung gandum,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , Casein hydrolase, KCL,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , dan  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  pH diatur sampai 7,0. Media yang telah diinokulasi diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 5 hari pada *shaker incubator*.

### 3.4.2 Isolasi phytase ekstrak kasar (*crude extract*)

Kultur bakteri *Bacillus amyloliquefaciens* yang telah difermentasi selama 5 hari disentrifus pada kecepatan 10.000 rpm, 4<sup>0</sup>C selama 10 menit. Supernatan yang mengandung phytase digunakan sebagai sumber enzim untuk diukur aktivitasnya.

### 3.4.3 Purifikasi phytase

Phytase ekstrak kasar dipurifikasi dengan metode Heinomen and Lahti (1981) dalam Hegeman and Grabau (2001). Phytase ekstrak kasar dipresipitasi dengan 0-40% amonium sulfat, kemudian disentrifus pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dipresipitasi kembali dengan amonium sulfat 40-90% disentrifus pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit, supernatan dibuang dan protein yang mengendap dilarutkan dalam 3 ml 100 mM bufer sodium asetat pH 5,0. Larutan phytase kemudian didialisis.

Dialisis bertujuan untuk menghilangkan amonium sulfat yang terikat pada phytase. Dialisis Phytase dilakukan selama 24 jam, pada suhu -4<sup>0</sup>C dengan pengaduk magnetik stirrer. Pelarut yang digunakan adalah 100 mM sodium asetat pH 5,0. Phytase hasil presipitasi yang telah didialisis diukur aktivitas dan kandungan proteinnya, kemudian dilakukan pemurnian dengan kolom kromatografi DEAE-cellulose.

Kolom kromatografi DEAE-celulosa bekerja berdasarkan ion exchanger. Pada penelitian ini digunakan DEAE-celulosa yang bermuatan positif dan elutor 1 M NaCl yang bermuatan negatif. Fraksi-fraksi yang didapatkan diukur aktivitas dan kandungan proteinnya. Fraksi yang memiliki aktivitas tertinggi digunakan dalam karakterisasi enzim.

### 3.4.4 Penentuan aktivitas phytase

Aktivitas phytase ditentukan berdasarkan ion phosphate yang dilepaskan dari substrat selama reaksi hidrolisis sesuai dengan metode Quan *et al.*, (2001) dan Wyss *et al.*, (1999). Substrat sebanyak 150  $\mu$ l (2.5 mM asam fitat dalam 100 mM sodium asetat pH 5,0) diinkubasi pada suhu 30<sup>0</sup>C selama 5 menit. Setelah 5

menit 100  $\mu\text{l}$  larutan phytase dimasukkan dan diinkubasi pada suhu  $30^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 250  $\mu\text{l}$  15% *Trichloro Acetic Acid* (TCA). Kemudian ditambah 1 ml colour reagent yang terdiri dari 6 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 2,5% ammonium molibdat dan 10% asam askorbat dan  $\text{H}_2\text{O}$ . Campuran diinkubasi pada suhu  $50^{\circ}\text{C}$  selama 20 menit. Ion phosphate yang dilepaskan diukur dengan spektrofotometer pada  $\lambda = 690 \text{ nm}$ . Satu unit aktivitas phytase didefinisikan sebagai sejumlah enzim yang dapat melepaskan 1  $\mu\text{mol}$  ion phosphate selama 1 menit.

#### 3.4.5 Pengukuran kandungan protein terlarut

Kandungan protein yang terlarut diukur dengan menggunakan metode Bradford (Bradford, 1976). Larutan phytase sebanyak 10  $\mu\text{l}$  ditambah 1 ml larutan bradford didiamkan selama 15 menit pada suhu ruang dan diukur absorbansinya pada spektrofotometer dengan  $\lambda = 595 \text{ nm}$ . Hasil percobaan dihitung dengan persamaan regresi kurva standart protein yaitu menggunakan standart BSA (*Bovine Serum Albumin*) 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

#### 3.4.6 Uji karakter phytase

Karakter phytase hasil purifikasi yang akan diuji meliputi suhu dan pH reaksi optimum, nilai  $V_{\text{maks}}$  dan  $K_m$  pada pH dan suhu optimum.

##### 3.4.6.1 Karakterisasi suhu

Karakterisasi suhu dilakukan dengan mereaksikan phytase dengan substrat (2,5 mM asam fitat dalam 100 mM sodium asetat pH 5,0) pada suhu yang berbeda-beda yaitu antara  $40^{\circ}\text{C}$ - $80^{\circ}\text{C}$  (interval 10).

##### 3.4.6.2 Karakterisasi pH

Karakterisasi pH dilakukan dengan mereaksikan phytase dengan pH substrat yang berbeda-beda yaitu antara 4 - 6 (interval 1).

##### 3.4.6.3 Karakterisasi $K_m$ dan $V_{\text{maks}}$

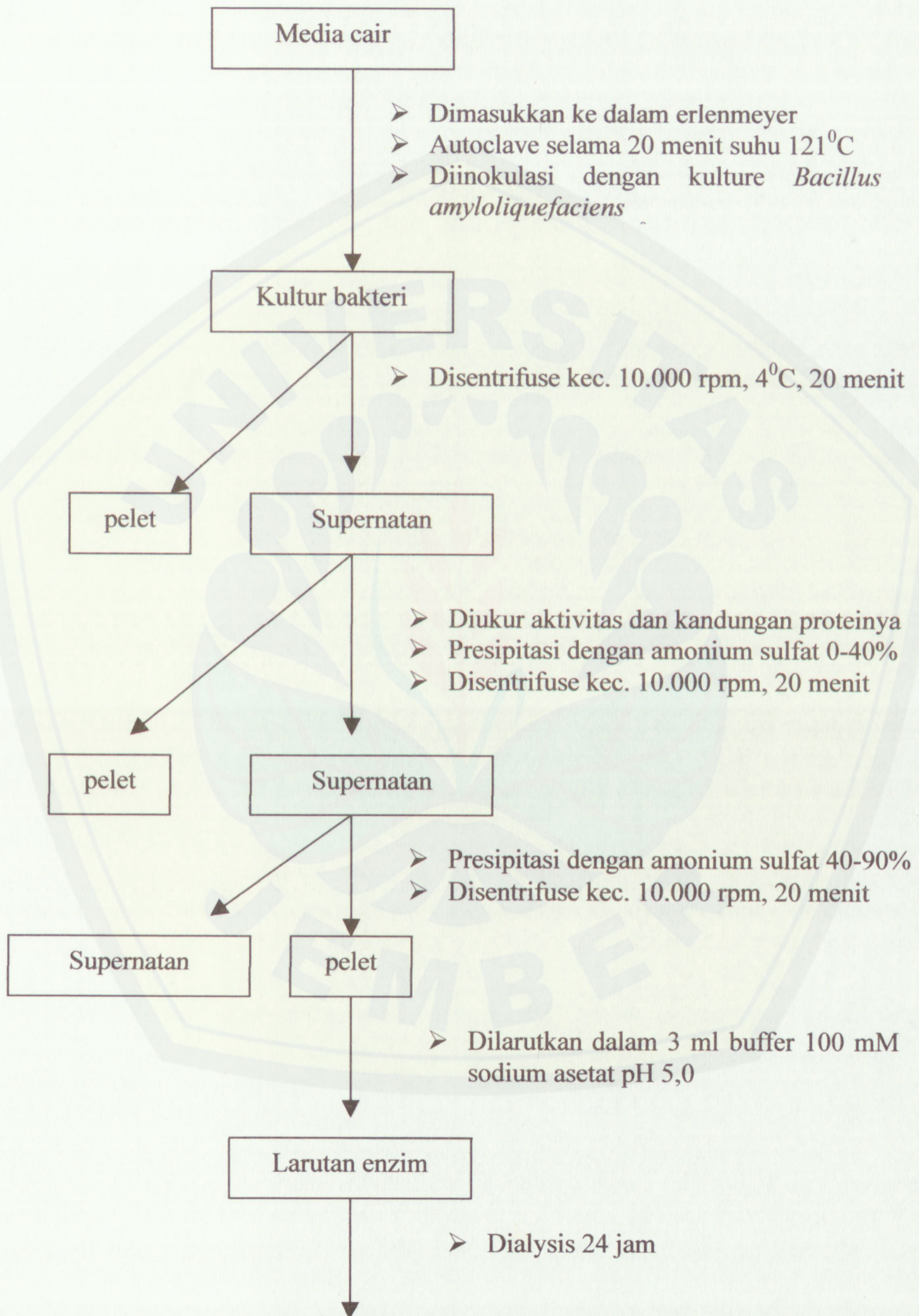
Nilai  $K_m$  dan  $V_{\text{maks}}$  dapat dicari dengan cara membuat grafik hubungan antara nilai  $1/[s]$  dengan nilai  $1/v$  kemudian dicari regresi liniernya. Nilai  $K_m$

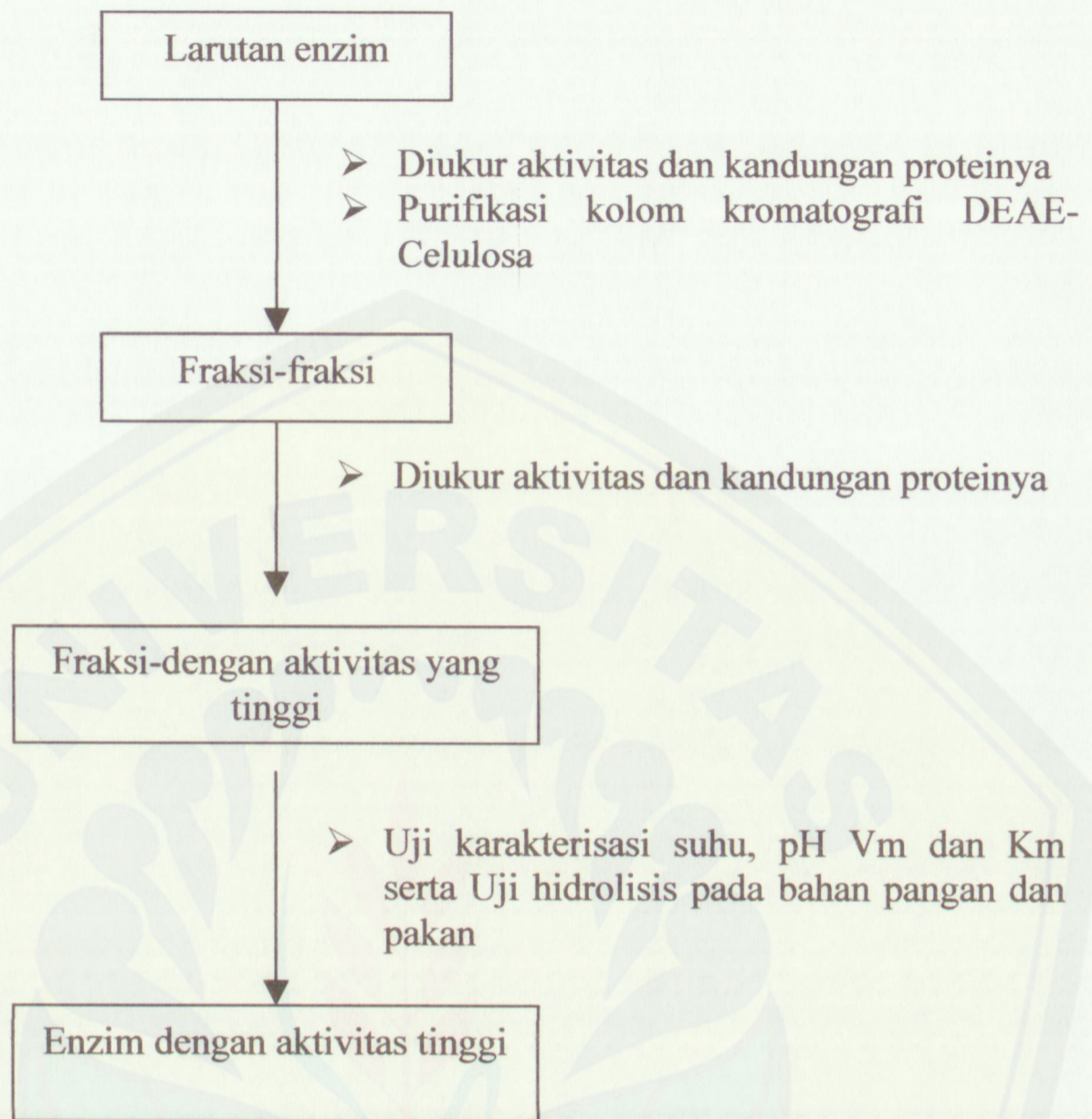
diperoleh dari persamaan  $b = 1/V_{maks}$ , dan nilai  $K_m$  diperoleh dari persamaan  $a = K_m/V_{maks}$  ( $a$  dan  $b$  adalah nilai persamaan regresi  $y = a + bx$  dari grafik hubungan antara nilai  $1/[s]$  dengan nilai  $1/v$ ), untuk mendapatkan nilai  $K_m$  dan  $V_{maks}$  phytase direaksikan dengan substrat pada konsentrasi yang berbeda-beda, yaitu (0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5) mM asam fitat.

#### 3.4.7 Uji kemampuan hidrolisis phytase terhadap asam fitat dalam bahan pangan

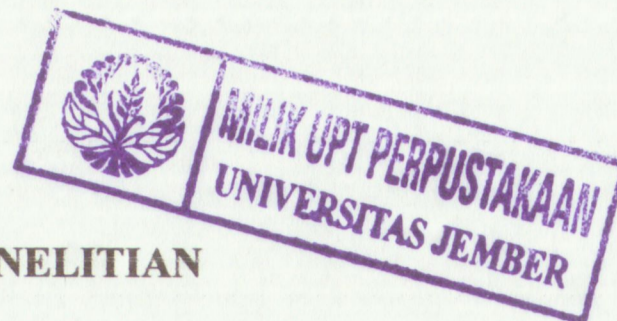
Untuk mengetahui kemampuan phytase yang dihasilkan dalam menghidrolisis asam fitat dalam bahan tanaman, dilakukan serangkaian reaksi hidrolisis dengan menggunakan asam fitat dalam bahan pangan mentah (tepung jagung dan tepung kedelai). Satu gram tepung kedelai dan tepung jagung diautoclave pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 20 menit kemudian ditambah 2 ml buffer sodium asetat pH optimum (5) lalu diinkubasi pada suhu optimum ( $70^{\circ}\text{C}$ ) selama 5 menit. Setelah itu ditambah 100  $\mu\text{l}$  larutan phytase. Campuran diinkubasi selama 3 jam pada suhu optimum ( $70^{\circ}\text{C}$ ) lalu disentrifus kecepatan 20.000 rpm selama 10 menit, diambil 100  $\mu\text{l}$  supernatannya kemudian ditambah 1 ml colour reagent diinkubasi pada suhu  $50^{\circ}\text{C}$  selama 20 menit, lalu diukur nilai absorbansinya dengan spektrofotometer dengan  $\lambda = 690 \text{ nm}$ . Besarnya aktivitas dilihat dari jumlah ion phosphate yang dilepaskan dalam waktu tertentu

## 3.5 Diagram Prosedur Kerja Penelitian





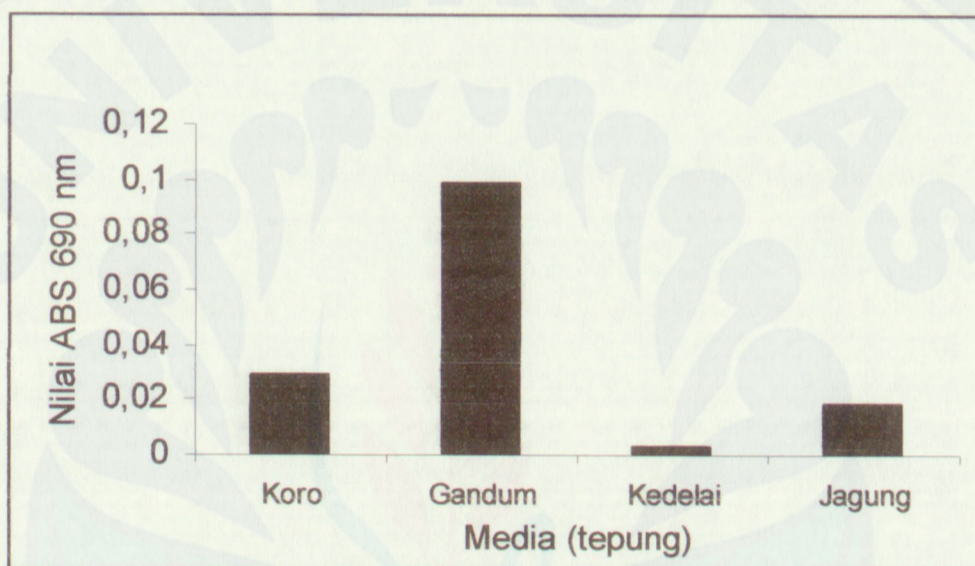




## BAB 4. HASIL PENELITIAN

### 4.1 Komposisi Media Cair

Pada penelitian ini digunakan 4 macam komposisi media cair yang berbeda (tepung jagung, koro, kedelai dan gandum) sebagai sumber asam fitat. Dari 4 komposisi media ini yang dapat mendukung pertumbuhan *Bacillus amyloliquefaciens* untuk menghasilkan phytase dengan aktivitas tinggi adalah komposisi media tepung gandum. Besarnya nilai aktivitas (ABS 690 nm) dapat dilihat pada grafik 4.1.



Grafik 4.1 Pengaruh substrat terhadap aktivitas phytase *Bacillus amyloliquefaciens*.

### 4.2 Purifikasi Phytase

Phytase ekstrak kasar (*crude extract*) dari kultur *Bacillus amyloliquefaciens* yang ditumbuhkan selama 5 hari dipresipitasi dengan amonium sulfat (40–90%), kemudian didialisis selama 24 jam dan difraksinasi dengan kolom kromatografi DEAE-cellulose. Hasil fraksinasi dengan kolom kromatografi DEAE-cellulose ini diambil fraksi yang memiliki aktivitas tertinggi dengan uji aktivitas dan fraksi ke 6 (lampiran F) memiliki aktivitas tertinggi. Besarnya aktivitas spesifik pada fraksi enzim hasil purifikasi dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Aktivitas spesifik phytase hasil purifikasi (pemurnian)

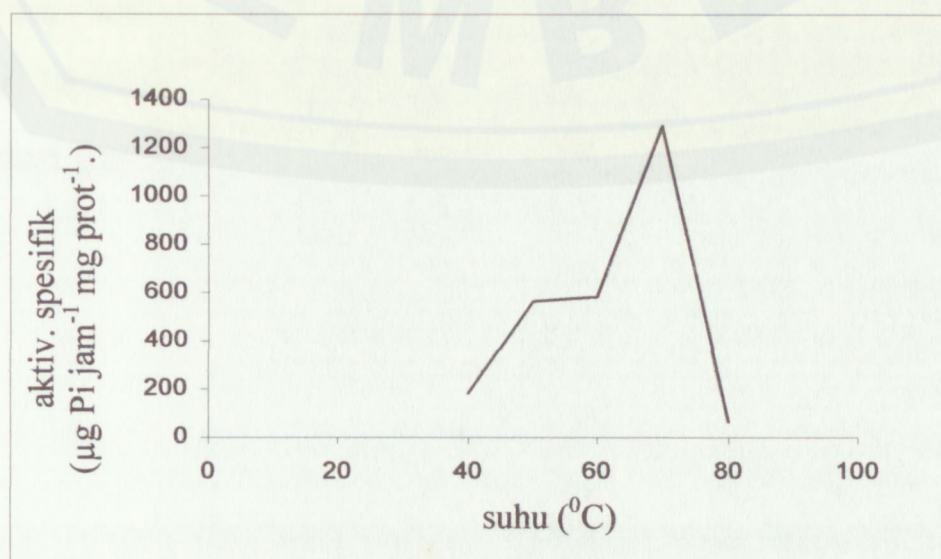
Fraksi	Vol. total ml	Prot. $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Prot. total mg	Aktiv. relatif $\mu\text{gPi}/100\mu\text{l}$	Total Aktiv. $\mu\text{gPi}/\text{jam}$	Aktiv. Spesifik ( $\mu\text{gPi jam}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ )	Fold
CE	222.0	0.068	15.296	0.026	116.772	7.634	1.000
40-90%	3.2	1.742	5.574	1.494	95.616	17.154	2.247
6	6.0	0.025	0.150	0.174	27.360	182.400	23.893

Keterangan : CE (*crude extract*), 40-90% (phytase hasil presipitasi amonium sulfat 40-90%), 6 (phytase hasil purifikasi dengan kolom kromatografi DEAE-cellulose fraksi no. 6).

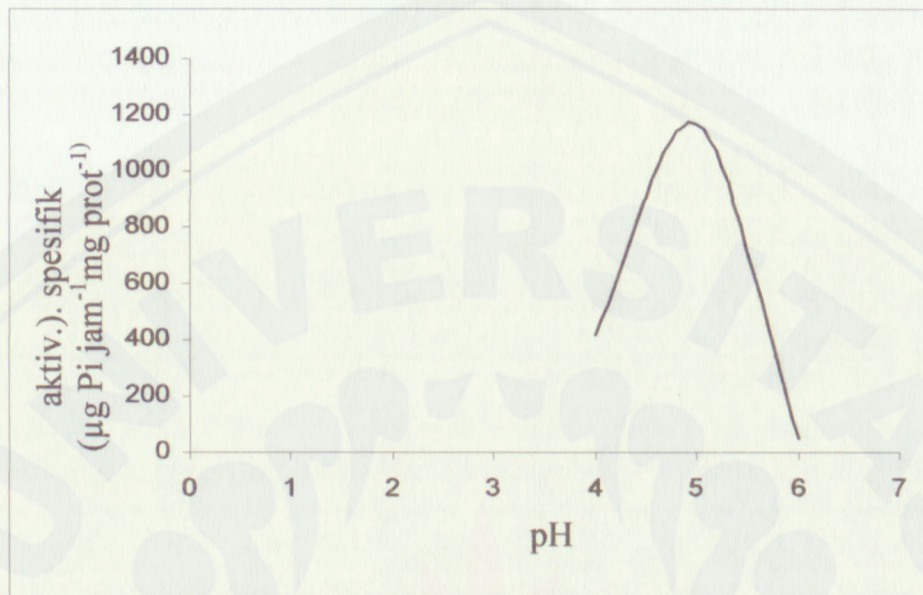
Pada Tabel 4.1 menunjukkan bahwa total protein mengalami penurunan setelah dipresipitasi dengan amonium sulfat 40-90% dan dipurifikasi dengan kolom kromatografi DEAE-cellulose, sedangkan aktivitas spesifik mengalami kenaikan. Hal ini diakibatkan protein selain phytase ikut terbuang pada saat presipitasi dengan amonium sulfat, selain itu juga disebabkan hanya fraksi aktif saja yang diuji aktivitas dan kandungan proteinnya. Hal ini sesuai dengan pernyataan Wirakartakusuma (dalam Dwinaningsih, 2002) yang menyatakan suatu enzim yang telah dimurnikan mengalami penurunan kandungan protein yang cukup besar, sedangkan aktivitasnya tetap baik. Bila penurunan kandungan protein enzim lebih besar daripada penurunan aktivitasnya, maka aktivitas spesifik enzim akan meningkat setelah pemurniaan.

### 4.3 Karakterisasi Phytase

Pada penelitian ini karakterisasi phytase yang dilakukan meliputi karakterisasi suhu dan pH optimum,  $K_m$  dan  $V_{maks}$ .

Grafik 4.2 Pengaruh suhu terhadap aktivitas phytase *Bacillus amyloliquefaciens*.

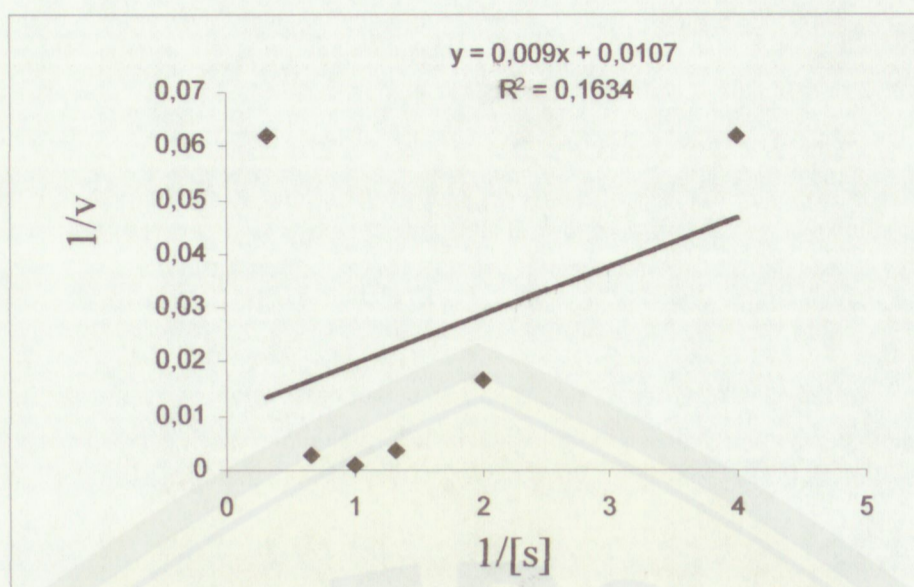
Pada Grafik 4.2 menunjukkan aktivitas spesifik phytase dalam menghidrolisis substrat (2.5 mM asam fitat dalam sodium asetat pH 5,0) pada suhu optimum 70<sup>0</sup>C dan menurun pada suhu diatas 70<sup>0</sup>C. Hasil karakterisasi suhu ini sesuai dengan pernyataan Kim *et al.*, (1998) yang menyatakan bahwa suhu optimum phytase *Bacillus amyloliquefaciens* adalah pada suhu 70<sup>0</sup>C.



Grafik 4.3 Pengaruh pH terhadap aktivitas phytase *Bacillus amyloliquefaciens*.

Pada Grafik 4.3 menunjukkan bahwa phytase *Bacillus amyloliquefaciens* bekerja secara optimum (aktivitas maksimal) pada pH 5,0. Aktivitas phytase akan menurun drastis pada saat pH lebih dari 5,0.

Karakter kinetik phytase meliputi nilai  $K_m$  dan  $V_{maks}$ . Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas phytase dilakukan pada kondisi optimum (pH 5,0 dan suhu 70<sup>0</sup>C). Nilai  $K_m$  dan  $V_{maks}$  dapat dicari dengan cara membuat grafik hubungan antara nilai  $1/[s]$  dengan nilai  $1/v$  kemudian dicari regresi liniernya. Nilai  $K_m$  diperoleh dari persamaan  $b = 1/V_{maks}$ , dan nilai  $K_m$  diperoleh dari persamaan  $a = K_m/V_{maks}$  ( $a$  dan  $b$  adalah nilai persamaan regresi  $y = a + bx$  dari grafik hubungan antara nilai  $1/[s]$  dengan nilai  $1/v$ ).



Garifik 4.4 Hubungan antara  $1/[s]$  dengan  $1/v$ .

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kecepatan maksimum ( $V_{maks}$ ) reaksi phytase *Bacillus amyloliquefaciens* sebesar  $111.11 \mu\text{Pi}/\text{jam}/\text{mg}$  protein dan nilai Konstanta Michaels-Menten ( $K_m$ ) sebesar  $1.189 \text{ mM}$  asam fitat.

#### 4.4 Hasil Uji Kemampuan Phytase dalam Menghidrolisis Asam Fitat pada Bahan Pangan dan Pakan.

Pada uji hidrolisis bahan pangan menggunakan tepung jagung dan kedelai yang direaksikan dengan  $100 \mu\text{l}$  phytase selama 3 jam, kemudian diukur dengan spektrofotometer  $\lambda = 690 \text{ nm}$ , hasil pengukuran dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Hasil uji kemampuan phytase dalam menghidrolisis asam fitat pada bahan pangan

Asam fitat	ABS. 690 nm	Total protein (mg)	Total aktiv. relatif ( $\mu\text{g Pi}/\text{jam}$ )	Aktiv. spesifik ( $\mu\text{gPi}^{-1} \text{ jam}^{-1} \text{ mg protein}$ )
Kedelai	0.0470	0.0025	0,882	352.8
Jagung	0.0735	0.0025	1.470	558.0

Pada Tabel 4.2 menunjukkan bahwa phytase yang dihasilkan oleh *Bacillus amyloliquefaciens* mempunyai aktivitas spesifik pada tepung kedelai sebesar  $352.8 \mu\text{Pi}/\text{jam}/\text{mg}$  protein sedangkan aktivitas spesifik pada tepung jagung sebesar  $558 \mu\text{Pi}/\text{jam}/\text{mg}$  protein.



## BAB 5. PEMBAHASAN

### 5.1 Komposisi Media Cair

Kemampuan *Bacillus amyloliquefaciens* untuk menghasilkan phytase sangat dipengaruhi oleh komposisi media dan lama fermentasi. Berdasarkan hasil penelitian dengan menggunakan fermentasi media cair yang diinkubasi selama 5 hari diperoleh phytase dengan aktivitas yang tinggi.

Dalam fermentasi media cair semua komponen yang dibutuhkan oleh *Bacillus amyloliquefaciens* selama pertumbuhannya mudah diserap. Dalam penelitian ini untuk menghasilkan phytase *Bacillus amyloliquefaciens* mendapatkan asam fitat dari tepung gandum. Hal ini membuktikan bahwa media tepung gandum merupakan media yang cocok untuk memproduksi phytase dari *Bacillus amyloliquefaciens* seperti pernyataan Wang *et al.*, (1979) adanya substrat yang sesuai sangat penting dalam fermentasi enzim. Gen struktural yang mengkode sintesis enzim umumnya inaktif ketika substrat enzim yang sesuai tidak terdapat dalam media sehingga produksi enzim terhambat.

### 5.2 Purifikasi Phytase

Total protein setelah purifikasi cenderung menurun dari setiap tahap perlakuan purifikasi. Hal ini dikarenakan penambahan amonium sulfat pada konsentrasi tertentu akan menyebabkan daya larut protein berkurang sehingga protein terpisah dengan endapan, tujuan dari perlakuan ini adalah untuk memekatkan enzim dan pemisahan komponen protein berdasarkan sifat ioniknya (Schopes, dalam Widowati dkk., 2000). Purifikasi phytase dalam penelitian ini menggunakan membran dialisis dan kolom kromatografi DEAE-cellulose yang bertujuan untuk memurnikan phytase dari senyawa protein yang lain. Purifikasi phytase dengan menggunakan membran dialisis untuk menghilangkan garam dan zat terlarut lainnya dengan prinsip difusi.

Perlakuan purifikasi dengan kolom kromatografi DEAE-cellulose protein yang bukan phytase akan terpisah dan terikat oleh ion  $\text{Na}^+$  dan  $\text{Cl}^-$  (elusinya), sehingga kemurniannya dan aktivitas spesifiknya semakin besar. Dari fraksinasi

yang dilakukan diperoleh 80 fraksi, tetapi yang terdapat phytase dengan aktivitas tertinggi adalah fraksi 6 (lampiran F). Hal ini sesuai dengan pernyataan Wirakartakusuma, dalam Dwinaningsih (2002) yang menyatakan bahwa suatu enzim yang telah dimurnikan kadang-kadang mengalami penurunan kandungan protein yang cukup besar sedangkan aktivitasnya tetap baik. Apabila penurunan kandungan protein enzim lebih besar daripada penurunan aktivitasnya, maka aktivitas spesifik enzim akan meningkat setelah pemurnian.

Pemurnian phytase dengan kolom kromatografi DEAE-cellulosa menghasilkan tingkat kemurnian sekitar 23.893 kali. Semakin murni suatu enzim, maka semakin tinggi pula aktivitas enzim tersebut. Aktivitas spesifik phytase *Bacillus amyloliquefaciens* yang dihasilkan dari isolasi media cair setelah dimurnikan mengalami peningkatan sebesar 23.893 kali bila dibandingkan dengan aktivitas spesifik *crude extract* (CE). Peningkatan aktivitas spesifik ini karena didalam larutan enzim tidak ada pengaruh dari senyawa lain atau enzim lain yang mungkin dapat berperan sebagai inhibitor terhadap aktivitas phytase.

### 5.3 Karakterisasi Phytase

Karakterisasi phytase dari *Bacillus amyloliquefaciens* dalam penelitian ini meliputi suhu optimum, pH optimum, Km dan Vmaks. Penentuan suhu dan pH optimum dimaksudkan untuk mendapatkan suhu dan pH yang tepat, dimana enzim bekerja dengan aktivitas tertinggi. Menurut Page (1997) pengaruh reaksi sebagian besar naik dengan naiknya suhu sampai batas tertentu. Suhu memiliki dua pengaruh yang berlawanan terhadap aktivitas enzim. Pertama, naiknya suhu akan menaikkan aktivitas enzim dan yang kedua naiknya suhu dapat mendenaturasi enzim.

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa phytase dari *Bacillus amyloliquefaciens* bekerja secara optimum pada suhu 70<sup>0</sup>C dan menurun pada suhu di atas suhu 70<sup>0</sup>C. Hal ini sesuai dengan pernyataan Pelezar (1986) bahwa aktivitas enzim bertambah dengan naiknya suhu sampai mencapai aktivitas optimum kemudian kenaikan suhu lebih lanjut berakibat dengan berkurangnya aktivitas enzim. Suhartono (1989) menyatakan bahwa dengan bertambahnya suhu,

terjadi kenaikan kecepatan reaksi enzim karena bertambahnya energi kinetik yang mempercepat gerak vibrasi, translasi, rotasi enzim dan substrat sehingga memperbesar peluang enzim dan substrat untuk bereaksi. Pada suhu yang lebih besar protein enzim mengalami perubahan konformasi yang bersifat determinal. Pada suhu tinggi substrat juga mengalami perubahan konformasi sehingga gugus reaktifnya tidak dapat lagi atau mengalami hambatan dalam memasuki sisi aktif enzim.

Setiap enzim yang dihasilkan oleh sel memiliki pH optimum bagi aktivitasnya dan produksinya (Palezar, 1986 dalam Munir, 2004). Menurut Page (1997) enzim dalam pH yang ekstrim akan menjadi tidak aktif. Pada penelitian ini phytase *Bacillus amyloliquefaciens* menunjukkan aktivitas optimum pada pH 5,0 dan mengalami penurunan aktivitas diatas pH 5,0 (Grafik 4.3) dan menurun pada pH diatas suhu 5,0. Hal ini sesuai dengan Page (1997) yang menjelaskan bahwa enzim dalam pH yang ekstrim akan menjadi tidak aktif.

Menurut Page (1997) konsentrasi substrat sangat mempengaruhi aktivitas berbagai enzim. Laju reaksi yang dikatalis mula-mula mengalami peningkatan dengan bertambahnya konsentrasi substrat. Pada penelitian ini untuk mendapatkan nilai  $K_m$  dan  $V_{maks}$ , phytase direaksikan dengan substrat dalam konsentrasi yang berbeda-beda. Dari hasil reaksi didapatkan nilai  $K_m$  sebesar 1.189 mM dan nilai  $V_{maks}$  111.11  $\mu\text{gPi}/\text{jam}/\text{mg}$  protein. Nilai  $K_m$  ini termasuk kecil bila dibandingkan dengan fitase *Aspergillus ficcum* yang mempunyai nilai  $K_m$  sebesar 2,34 mM asam fitat. Menurut Stryer (2000) nilai  $K_m$  yang kecil berarti bahwa dengan konsentrasi yang kecil sudah dapat mencapai kecepatan maksimum.

Nilai  $K_m$  dan  $V_{maks}$  suatu enzim sangat menentukan pembentukan kompleks antara enzim dan substrat, sehingga proses konversi substrat menjadi produk dapat berlangsung (Miswar, 2004). Nilai  $K_m$  menunjukkan tinggi rendahnya afinitas antara substrat dan enzim. Semakin rendah nilai  $K_m$  menunjukkan bahwa afinitasnya tinggi, sehingga molekul substrat dapat terionisasi secara cepat dan sempurna didaerah aktif enzim dan meningkatkan efek katalis suatu enzim. Nilai  $K_m$  juga menentukan konsentrasi minimal suatu reaksi akan dapat bereaksi (Fidiyawati, 2004).

#### 5.4 Uji Kemampuan Phytase dalam Menghidrolisis Asam Fitat pada Bahan Pangan dan Pakan.

Uji kemampuan phytase dalam menghidrolisis asam fitat pada bahan pangan bertujuan untuk mengetahui aktivitas phytase dalam menghidrolisis asam fitat yang terkandung di dalam bahan pangan tersebut. Dalam penelitian ini bahan pangan yang digunakan adalah tepung jagung dan tepung kedelai. Hal ini dikarenakan kandungan asam fitat dalam jagung dan kedelai cukup besar, yaitu pada jagung sebesar 0,83-2,22% (Reddy *et al.*, 1989) dan pada kedelai sebesar 0,706% (Fauzi, 1992).

Uji kemampuan phytase dalam menghidrolisis asam fitat pada bahan pangan digunakan suhu dan pH optimum (suhu 70<sup>0</sup>C dan pH 5,0) phytase *Bacillus amyloliquefaciens*. Hal ini sesuai dengan pernyataan Page (1997), yang menyatakan bahwa aktivasi enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya konsentrasi substrat dan enzim, pH, kelembaban adanya zat penghambat (inhibitor), adanya zat induksi (induktor). Pada hakekatnya segala sesuatu yang dapat mempengaruhi struktur tersier protein enzim akan dapat mempengaruhi laju reaksi enzim. Diantara beberapa faktor tersebut yang paling berpengaruh adalah suhu dan pH.

Tabel 4.2 menunjukkan bahwa phytase yang diisolasi dari *Bacillus amyloliquefaciens* mempunyai kemampuan dalam menghidrolisis asam fitat yang terdapat dalam bahan pangan dan pakan. dalam 1 jam mampu melepaskan phosphate anorganik sebesar 352.8 µgPi/jam/mg protein dari asam fitat yang terdapat dalam tepung kedelai dan 558 µgPi/jam/mg protein dari asam fitat yang terdapat dalam tepung jagung. Semakin banyak tepung kedelai dan tepung jagung yang dihidrolisis, maka semakin banyak pula phosphate anorganik yang dilepaskan oleh phytase *Bacillus amyloliquefaciens*.



## BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1 Kesimpulan

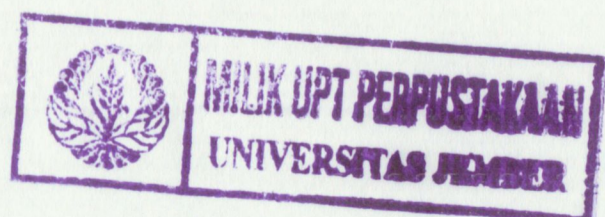
Kesimpulan yang dapat diperoleh dari hasil penelitian adalah.

- 1) Aktivitas phytase yang diisolasi dari *Bacillus amyloliquefaciens* dengan menggunakan media cair, setelah dipurifikasi total aktivitas relatif sebesar 27.360  $\mu\text{gPi/jam}$ , total protein sebesar 0.15 mg, dan aktivitas spesifiknya sebesar 182.400  $\mu\text{gPi/jam/mg protein}$ , dibandingkan dengan *crude extract* (CE) aktivitas spesifik phytase *Bacillus amyloliquefaciens* mengalami kenaikan sebesar 23.893 kali.
- 2) Karakter phytase yang dihasilkan oleh *Bacillus amyloliquefaciens* pada penelitian ini memiliki suhu optimum 70  $^{\circ}\text{C}$ , pH optimum 5,0, Km sebesar 1.189 mM dan  $V_{\text{maks}}$  sebesar 111.11  $\mu\text{gPi/jam/mg protein}$ .
- 3) Phytase yang di isolasi dari *Bacillus amyloliquefaciens* mampu menghidolisis asam fitat dalam tepung kedelai sebesar 352.8  $\mu\text{gPi/jam/mg protein}$  dan pada tepung jagung sebesar 558  $\mu\text{gPi/jam/mg protein}$ .

### 6.2 Saran

Perlu diadakan penelitian lebih lanjut tentang.

- 1) Perlu dilakukan pengujian lebih lanjut mengenai analisa elektroforesis SDS PAGE untuk mengetahui berat molekul dari phytase *Bacillus amyloliquefaciens* hasil fermentasi media cair.
- 2) Perlu dilakukan penelitian pemanfaatan phytase dalam kehidupan sehari-hari misalnya pengaplikasian pada hewan ternak.



DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2005. *Bacillus cereus* and Other bacillus sp. U.S. Food and Drug Administration. <http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/chap12.html>. [6 September 2005]
- Bergman, E.L. K. Autio, and A.S. Sandberg. 2000. Optimal Condition for Phytate Degradation Estimation of Phytase Activity and Localized of Phytase in Barley (cv. blenheim). *J. Agric. Food Chem*
- Berka, R.M., M. W. Rey, K.M. Brown, T. Byun and A.V. Klotz. 1998. Molecular Characterization and Expression of a Phytase Gene from the Thermophilic Fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 : 4423 – 4427
- Bradford M. M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem.* 72 : 248-254
- Bruce, A. 1989. *Molecular Biology of The Cell*, Garland Publishing. New York and London. 1219 P
- Cosgrove, D. J. 1980. *Inositol Phosphates: Their Chemistry, Biochemistry and Physiology*. New York. Elsevier
- Dwinaningsih, Y. 2002. Isolasi dan Karakterisasi Enzim Selulose dari *Aspergillus niger* L. yang Dihasilkan pada Proses Solid State Fermentation Ampas Tahu. Skripsi (tidak dipublikasikan). Jember: Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian UNEJ
- Fauzi, M. 1992. Kandungan Asam Fitat (Phytic Acid) pada Biji Polong-Polongan Jenis Lokal. Jember: DEPDIBUD UNEJ
- Fidiyawati, E. 2004. Aktivitas Fitase pada Beberapa Tingkat Perkecambahan Kedelai (*Glycine max* L. Merr.). Skripsi (tidak dipublikasikan). Jember : Fakultas Pertanian UNEJ
- Harbone, J.B. 1987. *Metode Fisikokimia*. Bandung: ITB
- Hegeman, C.E. and E.A. Grabau. 2001. A Novel Phytase with Sequence Similarity to Purple Acid Phosphatase is Expressed in Cotyledons of Germinating Soybean Seedlings. *Plant Physiol.* 126: 1598-1608
- <http://www.lp.itb.ac.id/product/vol32no2/mega/mega.htm>. [6 September 2005]

- Iglesias and Andreo. 1989. purification of NADP-Malic Enzym and Phosphoenolpyruvate Carboxylase from Sugar Cane Leaves. *Plant Cell physiology* 30 : 339-405
- Irving, G.C.J. and D.J. Cosgrove. 1971. Inositol Phosphate Phosphatase of Microbiol Origin. Observations on the Nature of the Active Center of A Bacterial (*Pseudomonas sp.*) phytase. *Austral. J boil. Sci* 24: 547-557
- John and Sons. 1990. *Molecular Biological Methods for Bacillus*. CR. Harwood and SM. Cutting. Chichester New York
- Jongbloed, A.W., Z. Mroz and P. A. Kemme. 1992. The Effect Supplementary *Aspergillus niger* Phytase in Diet for Pigs on Concentration and Apparent Digestibility of Dry Matter Total phosphorus and phytic Acid in Different Sections of the Elimentary Tract. *J. Anim. Sci.* 70 : 1159-1168
- Kerovuo, J. 2000. A Novel Phytase from *Bacillus* : Characterization and Production of the Enzim. Ph.D Dissertation, Univ. Helsinki Finland
- Kim, Y.O., J.K. Lee, H.K. Kim, J.H. Yu, and T.K. Oh. 1998. Cloning of thermostable Phytase gene (phy) from *Bacillus sp. DS 11* and its overexpresion in *Escherichia coli*. *FEMS. Mikrobiol*
- Liu, J., A. Rafiq, Y.M. Tzeng and A.Rob. 1998. The Introduction and Characterization Of Phytase and Beyond. *Enzym Microbial. Technol* 22: 415-424
- Liu, J., D.R. Ledoux and T.L. Veum. 1997. In Vitro Procedure for Przedicting the Enzymatic Dephosphorylation of Phytate in Com-Soybean Meal Diets for Growing Swine. *J. Agric. Food Chem* 45: 2612-2617
- Mahajan, A. and S., Dua. 1997. Nonchemical Approach for Reducing Antinutritional Factors in Rapeseed (*Brassica campestris* var. Torra) and Characterization of Enzyme Phytase. *J. Agric. Food Chem.* 45 :2504-2508
- Mikio, S. 1992. Purification and Characterization of Phytase from *Bacillus subtilis (natto) N-77*. *Enzyme Microb. Technol.* 56 : 1266-1269
- Miswar. 2004. Isolasi dan Purifikasi Fitase dari Kotiledon Kedelai (*Glycine max* L. Merr) Hasil Perkecambahan. *Majalah Ilmiah Peternakan* 9 : 45-49
- Morris, E.R. 1986. Phytate and Dertary Mineral Bioavaibility. In: *Phitic Acid Chemistry and Applications*. Minneapolis USA : E. Graf, Ed. Pilatus Press
- Munir, A. 2004. I Karakteristik Pembentukan Enzim Tannase oleh *Aspergillus niger* secara Fermentasi Kultur Terendam (submerged fermentation).

Skripsi (tidak dipublikasikan). Jember : Jurusan Teknologi Hasil Pertanian  
Fakultas Teknik Pertanian UNEJ

- Nagashima, T., T. Tange and H. Anazawa. 1999. Dephosphorylation of Phytase by Using The *Aspergillus niger* Phytase With A High Affinity for Phytate. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 : 4682-4684
- Nakamura, Y., H. Fukuhara and K. Sario. 2000. Secreted Phytase Activities of Yeast. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64 : 841-844
- Page, D.S. 1997. Prinsip-Prinsip Biokomia Edisi Kedua. Jakarta: Erlangga
- Pallauf, J. and G. Rimbach, 1996. Nutritional Significance of Phytic Acid and Phytase. *Arch. Anim. Nutr.* 50: 301-319
- Pelezar, M.J.Jr dan E.C.S. Chan. 1986. Dasar-Dasar Mikrobiologi. Terjemahan R.S. Hadioetomo, T. Imas and S.L. Angka dari Element of Microbiology (1979). Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia
- Powar, V. K. and V. Jagannathan. 1982. Purification and Properties of Phytate Specific Phosphatase from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 151 :1102-1108
- Quan, C.S., L.H. Zhang, Y.J. Wang and Y. Ohta. 2001. Production of Phytase in A low Phosphate Medium by A Novel Yeast *Candida krusei*. *J. Biosci. Bioeng.* 92 : 154-160
- , 2002. Purification and Properties of A Phytase from *Candida krusei* WZ-001. *J. Biosci. Bioeng.* 94 : 419-425
- Reddy, N.R., M.D. Pierson, S.K. Sathe and D.K. Salunkhe. 1989. Phytates in Cereals and Legumes. In : C.O. Cichester, E.M. Mrak, and G.F. Stewart (ed.). *In Food Research*. New York : Academic Press
- Rossomando. 1990. High performance Liquid Chromatografi in Enzymatic. New York: Analisis Willey
- Sangadji, I. 2004. Enzim Fitase dan Peranannya dalam Memecah Ikatan Asam Fitat pada Bahan Pakan. [www. Google \[serial on line\].  
http://tumautau.net/pps702.82034/insun-sangadji.pdf](http://tumautau.net/pps702.82034/insun-sangadji.pdf). [6 september 2005]
- Shi, J. H. Wang., Y. Wu., J. Hazebroek., R.B. Meeley and D.S. Enh. 2003. The Maize Low Phytic acid Mutant Lpa2 is Caused by Mutation in an Inositol Phosphate Kinase Gen. *Plant Phisiol.*
- Shieh, T.R. and J. H. Ware., 1968. Survey of Microorganism for The Production of Extracellular Phytase. *Appl. Environ. Microbiol.* 6 : 1348-1351.

- Shimizu, M. 1992. Purification and Characterization of a Phytase from *Bacillus subtilis (natto) N-77*. Biosci. Biothechnol. Biochem. 56 : 1266-1269
- Stryer, L. 2000. Biokimia. Jilid 1. Edisi Empat. Terjemahan M. Shadikin dari Biochemistry (1995). Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran ECG
- Suhartono, M.T.1989. Enzym dan Bioteknologi. Bogor: Departemen Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor
- Ullah, A. H. J. 1988a. *Aspergillus ficuum* phytase:partial primary structure, substrate selectivity, and kinetic karacterization. Prep. Biochem
- Ursula, K. and G. Ralf. 2004. Bacterial Phytase: Potential Application In Vivo Function and Regulation of its Synthesis.Germany: Centre for Molecular Biology
- Viveros, A., C. Canteno, A. Brenes, R. Canales, and S. Lozano. 2000. Phytase and Acid Phosphatase Activities in Plant Feedstuffs. J. agric. Food. Chem. 48 : 4009-4013
- Wang, D.I.C.,C.L.Coony, A.L. Demain,. Dunnill, A.E. Humprey and M.D. Lilly. 1979. Fermentation and Enzym Technology. New York: John Willey and Sons Inc
- Widowati, S., D. Andiani, E. I. Riyanti, P. Raharto, L. Sukarno. 2000. Karakteristik Fitase dari *Bacillus coagulans*.www. indibiogen.Or.id.[serial on line].<http://www.indibiogen. Or.id/terbitan/pdf>. [6 September 2005]
- Wilcox, J. R. G.S. Premchandra, K.A. Young and V. Raboy. 2000. Isolation of High Seed Inorganic P, Low Phytase Soybean Mutans. Crop Sci Vol 40: 1601-302
- Wodzinski, R. J. and A. H. Ullah, 1996. Phytase. Adv. Appl. Microbiol. Vol. 42 : 263-302
- Wyss, M. L., R. Brugger, A. Kronerberger, R. Remy, R. Fimbel, G. Oesterhelt, M. Lehman and A. P. G. M. Van Lonn.1999. Biophysical Characterization of Fungal Phytases (Myo-Inositol Hexakisphosphate Phosphohydrolases) : Molucular Size, Glikosylation Pattern, and Engineering of Proteolytic Resistance. Appl. Environ. Microbiol. 65 : 367-373

## Lampiran A. Matrik penelitian

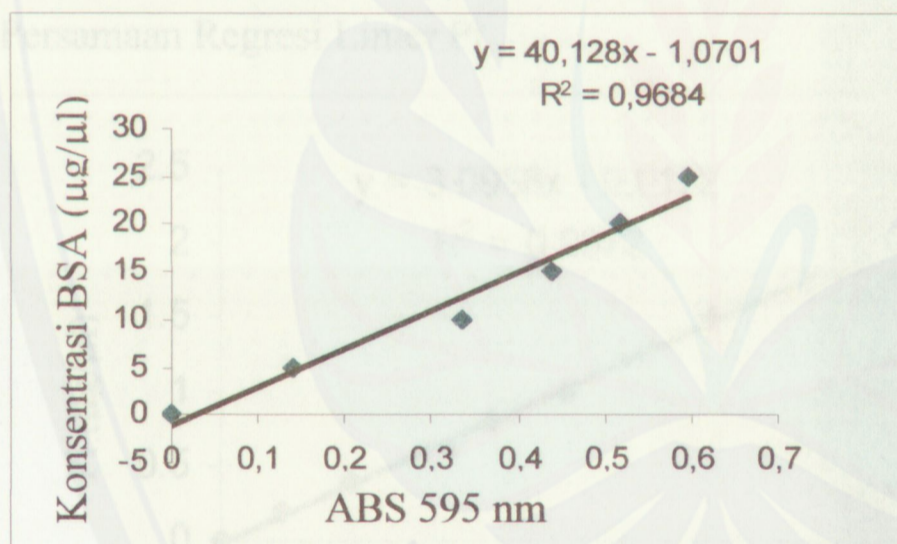
## Matrik Penelitian

JUDUL	LATAR BELAKANG	PERMASALAHAN	SUMBER DATA	METODOLOGI PENELITIAN
Induksi, Isolasi dan Karakterisasi Phytase dari <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Asam fitat ( <i>myo-inositol hexaphosphate</i> ) merupakan bentuk mineral phosphor yang tersimpan dalam tanaman (khususnya pada biji sereal dan legum) dapat mengikat mineral (P, Na <sup>+</sup> , Mg <sup>+</sup> , Ca <sup>+</sup> ), protein dan asam amino sehingga sulit diserap oleh hewan non ruminansia dan manusia. Phytase ( <i>myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase</i> ) mampu menghidrolisis asam fitat menjadi fosfat anorganik dan <i>myo-inositol</i> . Pemanfaatan phytase dalam menurunkan kadar asam fitat dalam bahan makanan dapat meningkatkan daya serap usus terhadap mineral, protein dan asam amino.	<p>4) Apakah bakteri <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> mampu menghasilkan enzim phytase?</p> <p>5) Bagaimana karakter phytase yang dihasilkan oleh bakteri <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ?</p> <p>6) Bagaimana kemampuan phytase yang dihasilkan dalam menghidrolisis asam fitat yang terdapat dalam bahan pangan dan pakan?</p>	<p>1. Data primer:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Hasil penelitian</li> </ul> <p>2. Data skunder:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Kepustakaan</li> <li>▪ dokumentasi</li> </ul>	<p>1. Tempat dan Waktu penelitian: di Laboratorium Pusat Penelitian Biologi Molekuler Universitas Jember dilaksanakan pada bulan April – September 2006.</p> <p>2. Menggunakan analisa deskriptif.</p>

## Lampiran B. kurva standart protein

**Kurva Standart Protein**

No	Konsentrasi BSA ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	Absorbansi 595 nm
1	0	0.000
2	0.2	0.140
3	0.4	0.336
4	0.6	0.438
5	0.8	0.517
6	1	0.598
7	1.5	0.598

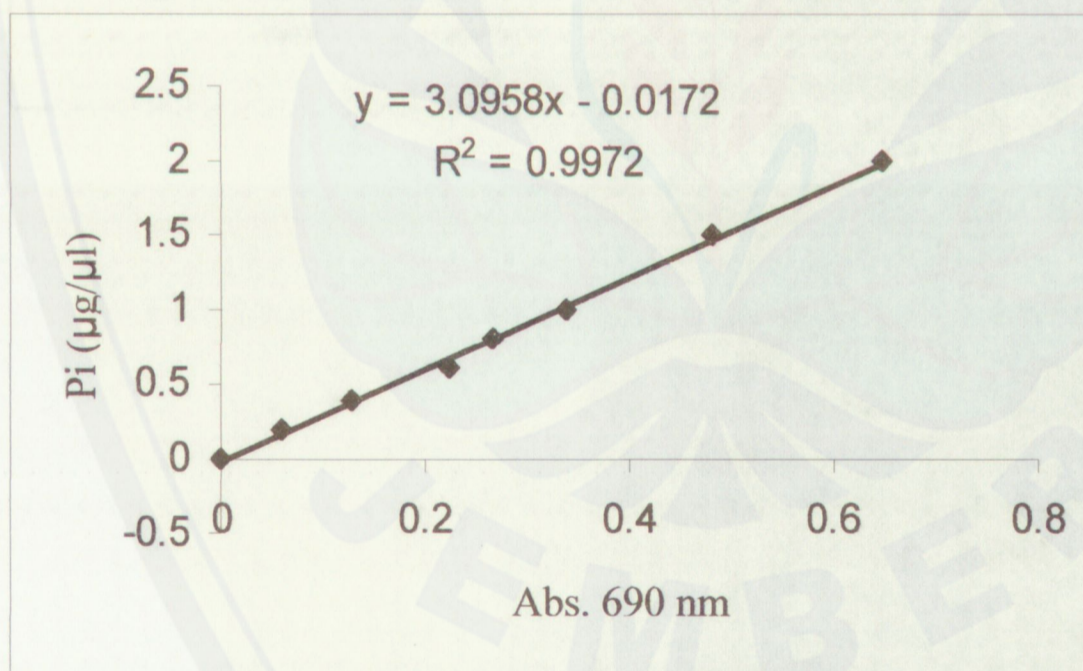
*Persamaan Regresi Linier Kandungan Protein*

Lampiran C. kurva standart Pi

### Kurva Standart Pi

No	Pi (y) mg	Abs. 690 nm (x)
1	0	0
2	0.2	0.061
3	0.4	0.129
4	0.6	0.224
5	0.8	0.265
6	1	0.337
7	1.5	0.481
8	2	0.647

Persamaan Regresi Linier Pi

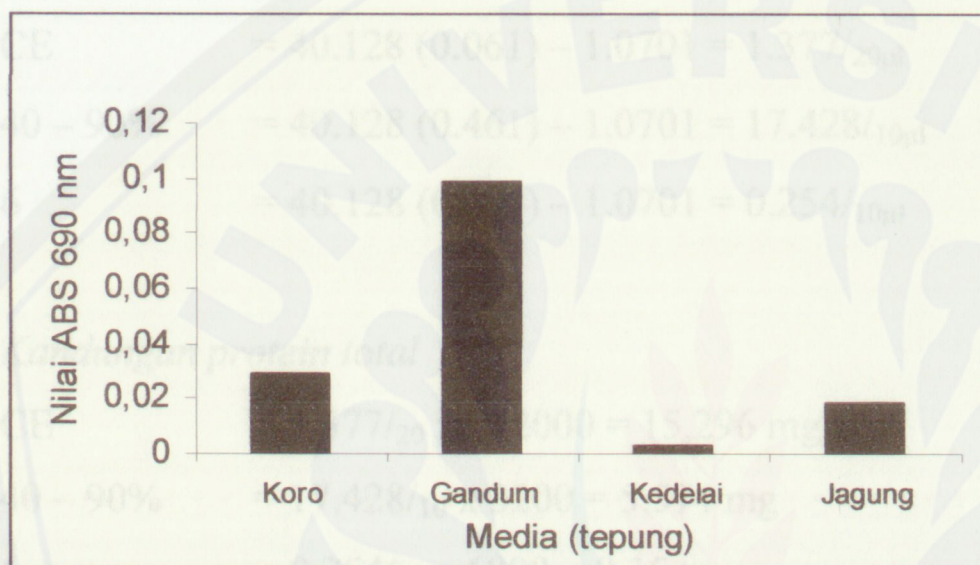




Lampiran D. Pengaruh media terhadap aktivitas (ABS 690) phytase *Bacillus amyloliquifaciens*

Media (tepung)	Nilai Abs 690	Volume Sampel (µl)	ABS 695 nm
Koro	0,029	20	0,061
Gandum	0,099	10	0,461
Kedelai	0,003	10	0,033
Jagung	0,018	10	0,033

Grafik Pengaruh subtrat terhadap aktivitas phytase *Bacillus amyloliquifaciens*



## Lampiran E. Hasil dan perhitungan kandungan protein

*Hasil uji kandungan protein*

Fraksi	Vol. total enzim ( $\mu$ )	Volume Sampel ( $\mu$ l)	ABS 595 nm
CE	222000	20	0.061
40 – 90%	3200	10	0.461
6	6000	10	0.033

$$Y = 40.128 X - 1,0701$$

$$\text{CE} = 40.128 (0.061) - 1.0701 = 1.377/_{20\mu\text{l}}$$

$$40 - 90\% = 40.128 (0.461) - 1.0701 = 17.428/_{10\mu\text{l}}$$

$$6 = 40.128 (0,033) - 1.0701 = 0.254/_{10\mu\text{l}}$$

*Kandungan protein total*

$$\text{CE} = 1.377/_{20} \times 222000 = 15,296 \text{ mg}$$

$$40 - 90\% = 17.428/_{10} \times 3200 = 5.574 \text{ mg}$$

$$6 = 0.254/_{10} \times 6000 = 0.15 \text{ mg}$$

Lampiran F. Kandungan protein dan aktivitas phytase *Bacillus amyloliquifaciens* hasil fraksinasi

Nomor fraksi	Kandungan Protein	Nilai aktivitas (ABS 690)
1	0.001	0.045
2	0.119	0.0195
3	0.031	0.002
4	0.013	0.0195
5	0.010	0.0015
6	0.034	0.079
7	0.058	0.003
8	0.059	0.002
9	0.066	0.007
10	0.079	0.027
11	0.082	0.0005
12	0.076	0.013
13	0.060	Tidak diukur
14	0.045	Tidak diukur
15	0.036	Tidak diukur
16	0.027	Tidak diukur
17	0.021	0.0025
18	0.110	0.016
19	0.108	0.0065
20	0.146	0.0095
21	0.142	0.002
22	0.142	Tidak diukur
23	0.041	Tidak diukur
24	0.012	Tidak diukur
25	0.004	Tidak diukur
26	0.007	Tidak diukur
27	0.005	Tidak diukur

28	0.003	Tidak diukur
29	0.001	Tidak diukur
30	0.003	Tidak diukur
31	0.002	Tidak diukur
32	0.001	Tidak diukur
33	0.001	Tidak diukur
34	0.001	Tidak diukur
35	0.001	Tidak diukur
36	0.000	Tidak diukur
37	0.001	Tidak diukur
38	0.000	Tidak diukur
39	0.000	Tidak diukur
40	0.003	Tidak diukur
41	0.004	Tidak diukur
42	0.030	Tidak diukur
43	0.000	Tidak diukur
44	0.047	Tidak diukur

*Catatan: mulai dari fraksi 45 sampai fraksi 80 sudah tidak ada kandungan proteinya dan tidak semua fraksi diukur aktivitasnya*

Fraksi	Vol. total (ml)	Protein (mg)
CE	227	6.000
40-90%	32	1.000
6	8	0.000

## Lampiran G. Hasil dan perhitungan uji aktivitas

*Hasil uji aktivitas*

Fraksi	Vol enzim ( $\mu$ )	Abs 690 nm
CE	222000	0.014
40 – 90%	3200	0.488
6	6000	0.079

*Aktivitas relatif ( $\mu$ Pi/100 $\mu$ l)*

$$Y = 3.096x - 0.017$$

$$\text{CE} = 3.096 (0.014) - 0.017 = 0.0263 \mu\text{Pi}/100\mu\text{l}$$

$$40 - 90\% = 3.096 (0.488) - 0.017 = 1.494 \mu\text{Pi}/100\mu\text{l}$$

$$6 = 3.096 (0.079) - 0.017 = 0.228 \mu\text{Pi}/100\mu\text{l}$$

*Aktivitas total ( $\mu$ Pi/jam)*

$$\text{CE} = 222000/100 \times 0.0263 \times 2 = 116.772 \mu\text{Pi}/\text{jam}$$

$$40 - 90\% = 3200/100 \times 1.494 \times 2 = 95.616 \mu\text{Pi}/\text{jam}$$

$$6 = 6000/100 \times 0.228 \times 2 = 27.36 \mu\text{Pi}/\text{jam}$$

*Aktivitas spesifik (aktivitas total/ $_{\text{protein total}}$ ) =  $\mu$ Pi jam<sup>-1</sup>mg protein<sup>-1</sup>*

$$\text{CE} = 116.722/15.296 = 7.634 \mu\text{Pi}/\text{jam}/\text{mg protein}$$

$$40 - 90\% = 95.616/5.296 = 17.154 \mu\text{Pi}/\text{jam}/\text{mg protein}$$

$$6 = 27.36 / 0.15 = 182.4 \mu\text{Pi}/\text{jam}/\text{mg protein}$$

*Rekapan hasil perhitungan kandungan protein dan uji aktivitas*

Fraksi	Vol. total Ml	Prot. $\mu$ g/ $\mu$ l	Prot. total mg	Aktiv. relatif $\mu$ gPi/100 $\mu$ l	Aktiv. Total $\mu$ gPi/jam	Aktiv. Spesifik ( $\mu$ gPi jam <sup>-1</sup> mg protein <sup>-1</sup> )	Fold
CE	222	0.0689	15.296	0.026	116.772	7.634	1.000
40-90%	3.2	1.742	5.574	1.494	95.616	17.154	2.247
6	6	0.025	0.150	0.228	27.360	182.400	23.893

## Lampiran H. Hasil dan perhitungan karakterisasi suhu

*Hasil pengukuran karakterisasi suhu*

Suhu (°C)	Abs. 690 nm	Total Protein (mg)	Volume total enzim (μl)
40	0.079	0.15	6000
50	0.232	0.15	6000
60	0.239	0.15	6000
70	0.525	0.15	6000
80	0.03	0.15	6000

*Aktivitas relatif (μPi/100μl)*

$$Y = 3.096x - 0.017$$

$$40^{\circ}\text{C} = 3.096 (0.079) - 0.017 = 0.227 \mu\text{Pi}/100\mu\text{l}$$

$$50^{\circ}\text{C} = 3.096 (0.232) - 0.017 = 0.701 \mu\text{Pi}/100\mu\text{l}$$

$$60^{\circ}\text{C} = 3.096 (0.239) - 0.017 = 0.723 \mu\text{Pi}/100\mu\text{l}$$

$$70^{\circ}\text{C} = 3.096 (0.525) - 0.017 = 1.608 \mu\text{Pi}/100\mu\text{l}$$

$$80^{\circ}\text{C} = 3.096 (0.03) - 0.017 = 0.076 \mu\text{Pi}/100\mu\text{l}$$

*Aktivitas total (μPi/jam)*

$$40^{\circ}\text{C} = 6000/100 \times 0.227 \times 2 = 27.24 \mu\text{Pi}/\text{jam}$$

$$50^{\circ}\text{C} = 6000/100 \times 0.701 \times 2 = 84.12 \mu\text{Pi}/\text{jam}$$

$$60^{\circ}\text{C} = 6000/100 \times 0.723 \times 2 = 86.76 \mu\text{Pi}/\text{jam}$$

$$70^{\circ}\text{C} = 6000/100 \times 1.608 \times 2 = 192.96 \mu\text{Pi}/\text{jam}$$

$$80^{\circ}\text{C} = 6000/100 \times 0.076 \times 2 = 9.12 \mu\text{Pi}/\text{jam}$$

*Aktivitas spesifik (aktiv. Total/ protein total) μPi jam<sup>-1</sup> mg protein<sup>-1</sup>*

$$40^{\circ}\text{C} = 27.24 / 0.15 = 181.6 \mu\text{Pi}/\text{jam}/\text{mg protein}$$

$$50^{\circ}\text{C} = 84.12 / 0.15 = 560.8 \mu\text{Pi}/\text{jam}/\text{mg protein}$$

$$60^{\circ}\text{C} = 86.76 / 0.15 = 578.4 \mu\text{Pi}/\text{jam}/\text{mg protein}$$

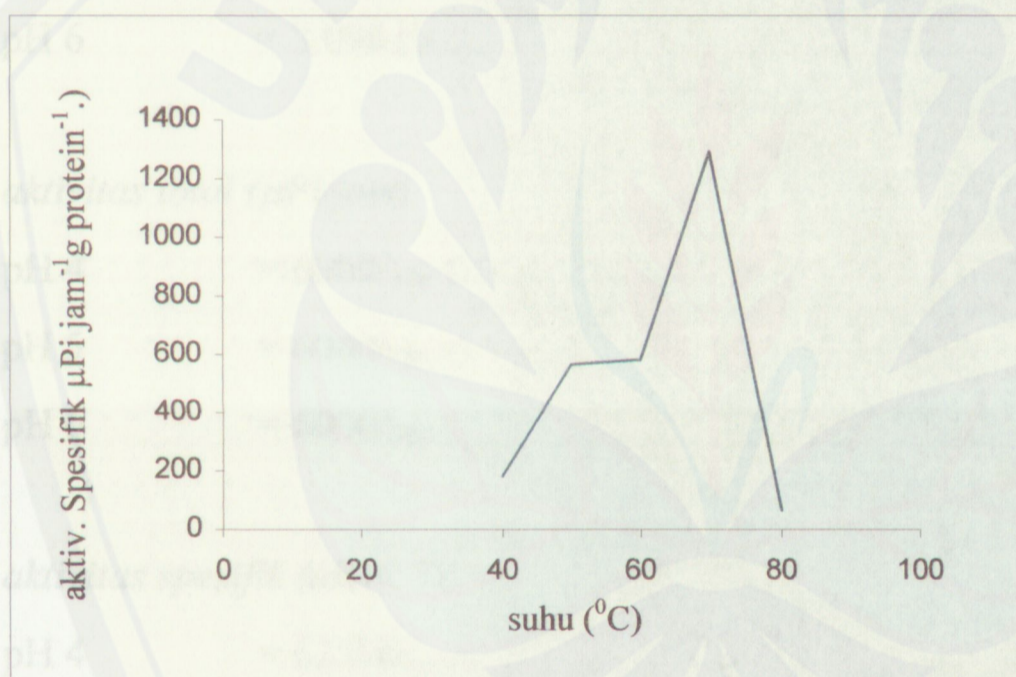
$$70^{\circ}\text{C} = 192.96 / 0.15 = 1286.4 \mu\text{Pi}/\text{jam}/\text{mg protein}$$

$$80^{\circ}\text{C} = 9.12 / 0.15 = 60.8 \mu\text{Pi}/\text{jam}/\text{mg protein}$$

## Rekapan hasil perhitungan karakterisasi suhu

Suhu ( $^{\circ}\text{C}$ )	Abs. 690 nm	Total Protein (mg)	Tot. aktv. relatif ( $\mu\text{gPi}/\text{jam}$ )	Aktiv spesifik $\mu\text{Pi jam}^{-1}\text{mg protein}^{-1}$
40	0.079	0.15	27.24	181.6
50	0.232	0.15	84.12	560.8
60	0.239	0.15	86.76	578.4
70	0.525	0.15	192.96	1286.4
80	0.03	0.15	9.12	60.8

## Grafik karakterisasi suhu



## Lampiran I. Hasil dan perhitungan karakterisasi pH

*Hasil pengukuran karakterisasi pH*

pH	Abs. 690 nm	Total Protein (mg)	Volume total enzim ( $\mu\text{l}$ )
4	0.190	0.15	6000
5	0.494	0.15	6000
6	0.044	0.15	6000

*Aktivitas relatif*

$$Y = 3.096x - 0.017$$

$$\text{pH 4} = 3.096 (0.190) - 0,017 = 0.517 \mu\text{Pi}/100\mu\text{l}$$

$$\text{pH 5} = 3.096 (0.494) - 0,017 = 1.512 \mu\text{Pi}/100\mu\text{l}$$

$$\text{pH 6} = 3.096 (0.044) - 0,017 = 0.119 \mu\text{Pi}/100\mu\text{l}$$

*aktivitas total ( $\mu\text{Pi}/\text{jam}$ )*

$$\text{pH 4} = 6000/100 \times 0.517 \times 2 = 68.52 \mu\text{Pi}/\text{jam}$$

$$\text{pH 5} = 6000/100 \times 1.512 \times 2 = 181.44 \mu\text{Pi}/\text{jam}$$

$$\text{pH 6} = 6000/100 \times 0.119 \times 2 = 14.28 \mu\text{Pi}/\text{jam}$$

*aktivitas spesifik (aktiv. Total/ protein total)  $\mu\text{Pi jam}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$* 

$$\text{pH 4} = 62.04/0.15 = 455 \mu\text{Pi}/\text{jam}/\text{mg protein}$$

$$\text{pH 5} = 181.44 /0.15 = 1209.6 \mu\text{Pi}/\text{jam}/\text{mg protein}$$

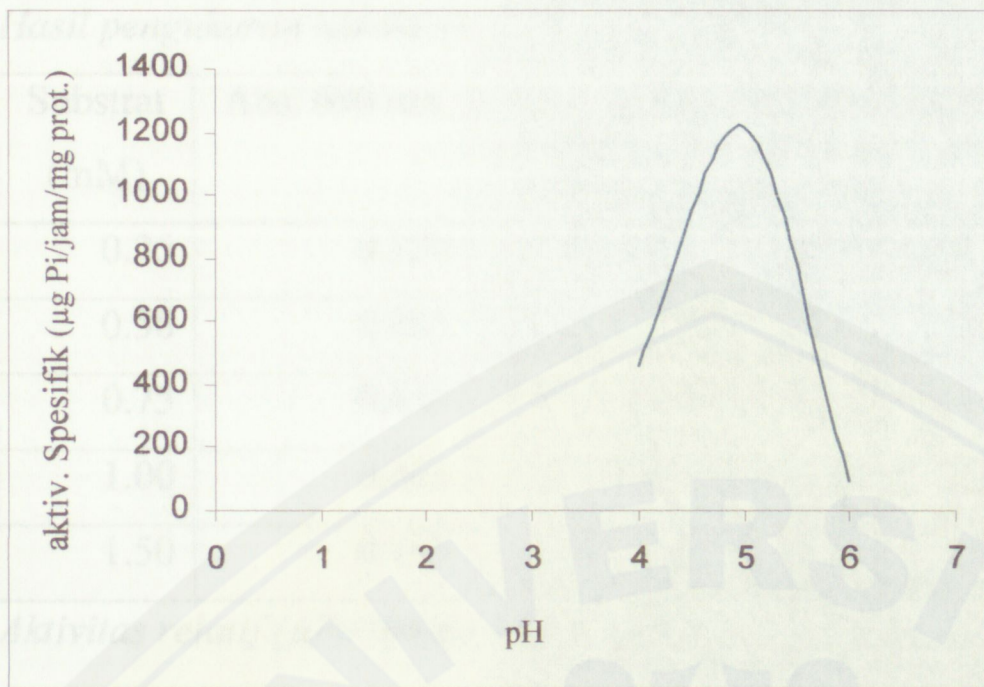
$$\text{pH 6} = 14.28 /0.15 = 95.2 \mu\text{Pi}/\text{jam}/\text{mg protein}$$

*rekapitan hasil perhitungan karakterisasi pH*

pH	Abs. 690 nm	Total Protein (mg)	Tot. aktv. relatif ( $\mu\text{gPi}/\text{jam}$ )	Aktiv. spesifik ( $\mu\text{Pi jam}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ )
4	0.190	0.15	68.52	455
5	0.494	0.15	181.44	1209.6
6	0.044	0.15	14.28	95.2



Grafik karakterisasi pH



Lampiran J. Karakterisasi  $V_m$  dan  $K_m$ *Hasil pengukuran karakterisasi  $V_m$  dan  $K_m$* 

Substrat (mM)	Abs. 690 nm
0.25	0.120
0.50	0.465
0.75	0.647
1.00	0.463
1.50	0.143

*Aktivitas relatif ( $\mu\text{Pi}/100\mu\text{l}$ )*

$$Y = 3.096x - 0.017$$

$$\begin{aligned} [0.25] &= 3.096 (0.120) - 0.017 = 0.356 \mu\text{Pi}/100\mu\text{l} \\ [0.5] &= 3.096 (0.465) - 0.017 = 1.422 \mu\text{Pi}/100\mu\text{l} \\ [0.75] &= 3.096 (0.647) - 0.017 = 1.986 \mu\text{Pi}/100\mu\text{l} \\ [1.00] &= 3.096 (0.463) - 0.017 = 1.433 \mu\text{Pi}/100\mu\text{l} \\ [1.50] &= 3.096 (0.143) - 0.017 = 0.426 \mu\text{Pi}/100\mu\text{l} \end{aligned}$$

*Aktivitas total ( $\mu\text{Pi}/\text{jam}$ )*

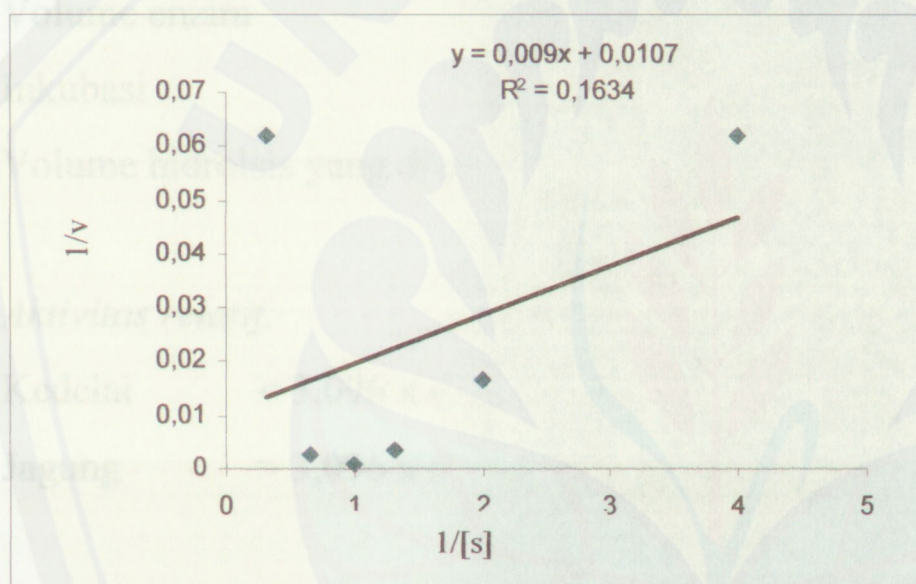
$$\begin{aligned} [0.25] &= 6000/100 \times 0.356 \times 2 = 42.72 \mu\text{Pi}/\text{jam} \\ [0.5] &= 6000/100 \times 1.422 \times 2 = 170.64 \mu\text{Pi}/\text{jam} \\ [0.75] &= 6000/100 \times 1.986 \times 2 = 238,32 \mu\text{Pi}/\text{jam} \\ [1.00] &= 6000/100 \times 1.433 \times 2 = 171,96\mu\text{Pi}/\text{jam} \\ [1.50] &= 6000/100 \times 0.426 \times 2 = 51.12 \mu\text{Pi}/\text{jam} \end{aligned}$$

*Aktivitas spesifik (aktiv. Total/ protein total)  $\mu\text{Pi}/\text{jam}/\text{mg}$  protein sebagai nilai  $V$* 

$$\begin{aligned} [0.25] &= 42.72/0.15 = 284.8 \mu\text{Pi}/\text{jam}/\text{mg} \text{ protein} \\ [0.5] &= 170.64 /0.15 = 1137.6 \mu\text{Pi}/\text{jam}/\text{mg} \text{ protein} \\ [0.75] &= 238,32 /0.15 = 1588.8 \mu\text{Pi}/\text{jam}/\text{mg} \text{ protein} \\ [1.00] &= 171,96/0.15 = 1146.4 \mu\text{Pi}/\text{jam}/\text{mg} \text{ protein} \\ [1.50] &= 51.12 /0.15 = 340.8 \mu\text{Pi}/\text{jam}/\text{mg} \text{ protein} \end{aligned}$$

Rekapan hasil perhitungan uji  $V_m$  dan  $K_m$ 

Substrat (mM)	Abs. 690 nm	$v$ ( $\mu\text{gPi}^{-1} \text{jam}^{-1} \text{mg protein}$ )	$1/[s]$ (mM)	$[1/v]$ ( $\mu\text{Pi jam}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ )
0.25	0.120	284.8	4	0.0035
0.50	0.465	1137.6	2	0.00087
0.75	0.647	1588.8	1.33	0.00062
1.00	0.463	1146.4	1	0.00087
1.50	0.143	340.8	0.67	0.0029

Grafik hubungan antara  $1/[s]$  terhadap  $1/v$ Grafik hubungan antara  $1/[s]$  terhadap  $1/v$ 

$$Y = a + bx$$

$$Y = 0.0107 + 0.009x$$

$$b = 1/v \text{ maks}$$

$$0.009 = 1/v \text{ maks}$$

$$V \text{ maks} = 111.11 \mu\text{Pi/jam/mg protien}$$

$$a = K_m/V \text{ maks}$$

$$0.0107 = K_m/V \text{ maks}$$

$$K_m = 0.0107 \times 111.11$$

$$K_m = 1.189 \text{ mM}$$

Lampiran K. Hasil Uji Kemampuan Hidrolisis Phytase Terhadap Asam Fitat dalam Bahan Pangan dan Pakan.

Untuk 100  $\mu$ l

	ABS.	Total protein (mg)	Total aktiv. relatif ( $\mu$ g Pi/jam)	Aktiv. spesifik ( $\mu$ gPi/jam/mg protein)
Asam fitat	690 nm			
Kedelai	0.047	0.0025	0,882	352.8
Jagung	0.0735	0.0025	1.47	558

Berat tepung kedelai dan jagung masing-masing 1 gr.

Volume buffer = 2000  $\mu$ l  
 Volume enzim = 100  $\mu$ l } 2100  $\mu$ l  
 Inkubasi = 3 jam  
 Volume hidrolisis yang diukur Pi = 100 $\mu$ l

*Aktivitas relatif:*

Kedelai =  $3,096 \times (0,047) - 0,017 = 0,128 \mu\text{gPi}/3\text{jam}/100\mu\text{l}$   
 Jagung =  $3,096 \times (0,0735) - 0,017 = 0,21 \mu\text{gPi}/3 \text{ jam}/100\mu\text{l}$

*Aktivitas relatif per jam*

Kedelai =  $0,017/3 = 0,0426 \mu\text{gPi}/\text{jam}/100\mu\text{l}$   
 Jagung =  $0,21/3 = 0,07 \mu\text{gPi}/\text{jam}/100\mu\text{l}$

*Aktivitas total (volume 2100  $\mu$ l)*

Kedelai =  $0,0426 \times 21 = 0,835 \mu\text{gPi}/\text{jam}$   
 Jagung =  $0,07 \times 21 = 1,47 \mu\text{gPi}/\text{jam}$

*Aktivitas relatif*

Aktivitas relatif = aktivitas total/protein total

Kedelai =  $2,835/0,0025 = 352,8 \mu\text{gPi}/\text{jam}/\text{mg protein}$   
 Jagung =  $1,47/0,0025 = 588 \mu\text{gPi}/\text{jam}/\text{mg protein}$

Kandungan protein dalam 100  $\mu\text{l}$  enzim

Volume enzim 6000  $\mu\text{l}$  total proteinnya 0,15 gr

Untuk 100  $\mu\text{l}$ :

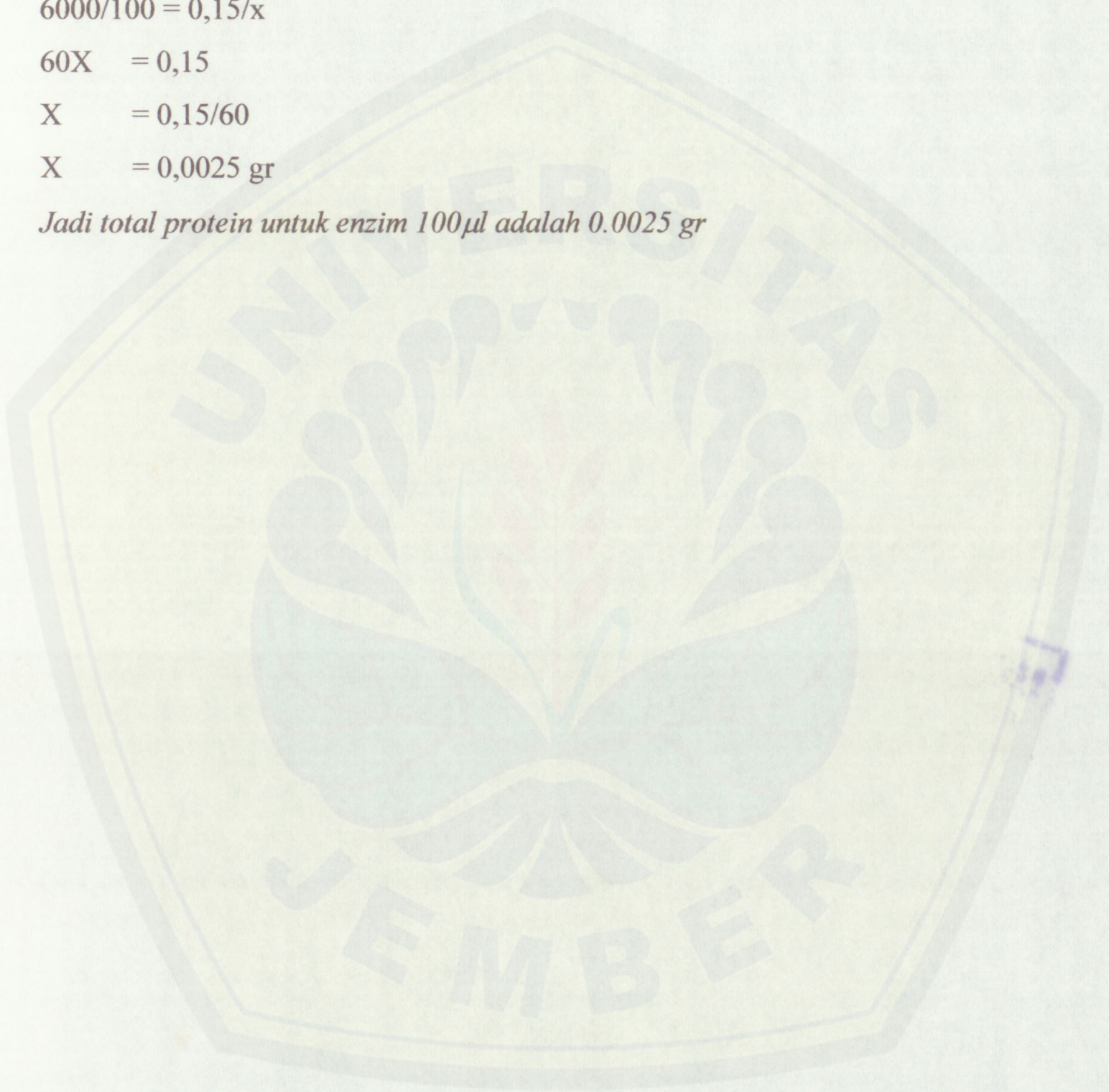
$$6000/100 = 0,15/x$$

$$60X = 0,15$$

$$X = 0,15/60$$

$$X = 0,0025 \text{ gr}$$

*Jadi total protein untuk enzim 100 $\mu\text{l}$  adalah 0.0025 gr*



Lampiran 1 Foto Penelitian



Foto autoclave, untuk mensterilkan media cair



Foto sentrifuse, untuk memisahkan *crude enzym*



Foto mereaksikan enzim phytase *Bacillus amyloliquefaciens*



Foto Water bath, untuk menginkubasi reaksi enzim phytase *Bacillus amyloliquefaciens*



Foto fraksinasi, untuk fraksinasi enzim phytase *Bacillus amyloliquefaciens*



Foto spektrofotometer, untuk mengukur uji aktivitas dan kandungan protein



DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL  
UNIVERSITAS JEMBER  
FAKULTAS KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN

LEMBAR KONSULTASI SKRIPSI

Nama Mahasiswa : Sunarman  
 NIM Skripsi : 020210103072  
 Judul Skripsi : Induksi, Isolasi dan Karakterisasi Phytase dari *Bacillus amyloliquefaciens*  
 Tanggal Ujian : Oktober 2006  
 Pembimbing 1 : Ir. Miswar, M.Si

KEGIATAN KONSULTASI

No	Hari/Tanggal	Materi Konsultasi	T.T Pembimbing
1	8 September 2005	Judul	Miswar
2	10 Oktober 2005	Bab 1, 2, 3	Miswar
3	20 November 2005	Bab 1, 2, 3	Miswar
4	29 November 2005	Bab 1, 2, 3	Miswar
5	8 Desember 2005	Bab 1, 2, 3	Miswar
6	19 September 2006	Bab 4	Miswar
7	24 September 2006	Bab 4	Miswar
8	25 September 2006	Bab 4, 5, 6	Miswar
9	30 September 2006	Bab 4, 5, 6	Miswar
10	3 Oktober 2006	Bab 4, 5, 6	Miswar

DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL  
 UNIVERSITAS JEMBER  
 FAKULTAS KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN

LEMBAR KONSULTASI SKRIPSI

Nama Mahasiswa : Sunarman  
 NIM/Angkatan : 020210103072/2002  
 Judul Skripsi : Induksi, Isolasi dan Karakterisasi Phytase dari *Bacillus amyloliquefaciens*  
 Tanggal Ujian : Oktober 2006  
 Pembimbing 2 : Dr. Joko Waluyo, M.Si

KEGIATAN KONSULTASI

No	Hari/Tanggal	Materi Konsultasi	T.T Pembimbing
1	8 September 2005	Judul	<i>[Signature]</i>
2	10 Oktober 2005	Bab 1, 2, 3	<i>[Signature]</i>
3	20 November 2005	Bab 1, 2, 3	<i>[Signature]</i>
4	29 November 2005	Bab 1, 2, 3	<i>[Signature]</i>
5	8 Desember 2005	Bab 1, 2, 3	<i>[Signature]</i>
6	19 September 2006	Bab 4	<i>[Signature]</i>
7	24 September 2006	Bab 4	<i>[Signature]</i>
8	25 September 2006	Bab 4, 5, 6	<i>[Signature]</i>
9	30 September 2006	Bab 4, 5, 6	<i>[Signature]</i>
10	3 Oktober 2006	Bab 4, 5, 6	<i>[Signature]</i>



DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL  
UNIVERSITAS JEMBER

FAKULTAS KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN

Alamat : Jl. Kalimantan III/3 kampus tegalboto Kotak Pos 162 Telp/Fak (0331) 334988 Jember 68121

Nomor : 13 19 / J.25.1.5 / PL - 5 / 2006

28 APR 2006

Lampiran : -

Perihal : Ijin Penelitian

Kepada : Yth. Ketua Laboratorium Pusat Penelitian  
Biologi Molekuler Universitas Jember



Dekan Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Jember menerangkan bahwa Mahasiswa tersebut di bawah ini:

Nama : SUNARMAN

Nim : 020210103072

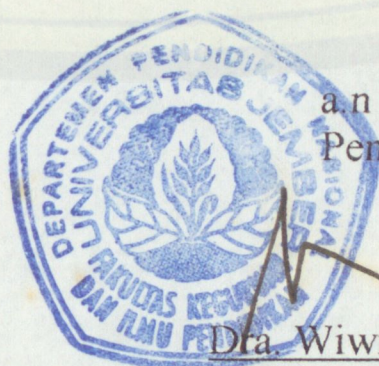
Jurusan/ Program : P. MIPA/ P. BIOLOGI

Berkenaan dengan penyelesaian studinya, mahasiswa tersebut bermaksud melaksanakan penelitian di lembaga yang Saudara pimpin dengan Judul :

INDUKSI, ISOLASI DAN KARAKTERISASI PHYTASE dari *Bacillus* sp.

Sehubungan dengan hal tersebut, kami mohon kepada Saudara agar memberikan ijin, dan sekaligus bantuan informasi yang diperlukannya.

Demikian atas kerjasamanya kami mengucapkan terima kasih.



a.n Dekan  
Pembantu Dekan I

Dra. Wiwik Eko Bindarti, M. Pd

NIP. 131 475 844