



**AKTIVITAS FITASE PADA BEBERAPA TINGKAT
PERKECAMBAHAN KEDELAI**
(*Glycine max* L. Merr)

**KARYA ILMIAH TERTULIS
(SKRIPSI)**

Diajukan Guna Memenuhi Salah Satu Syarat untuk
Menyelesaikan Pendidikan Program Strata Satu
Jurusan Budidaya Pertanian Program Studi Agronomi
Fakultas Pertanian Universitas Jember

Oleh:

Eni Fidiyawati
NIM. 001510101233

Asal :	Hadiah	Klass
Terima :	10 MAR 2005	653.3421
No. Induk :		FID
Pengkatalog :	<i>SM</i>	a

**DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS PERTANIAN**

Oktober 2004

KARYA ILMIAH TERTULIS BERJUDUL

**AKTIVITAS FITASE PADA BEBERAPA TINGKAT
PERKECAMBAHAN KEDELAI
(*Glycine max* L. Merr)**

Oleh
Eni Fidiyawati
NIM. 001510101233

Dipersiapkan dan disusun dibawah bimbingan

Pembimbing Utama : Ir. Miswar,MSi
NIP. 131 880 473

Pembimbing Anggota : Ir. Irwan Sadiman,MP
NIP.131 287 089

KARYA ILMIAH TERTULIS BERJUDUL

**AKTIVITAS FITASE PADA BEBERAPA TINGKAT
PERKECAMBAHAN KEDELAI
(*Glycine max* L. Merr)**

Dipersiapkan dan disusun oleh

Eni Fidiyawati
NIM.001510101233

Telah diuji pada tanggal
30 Oktober 2004

Dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

TIM PENGUJI

Ketua,


Ir. Miswar, MSi
NIP. 131 880 473

Anggota I



Ir. Irwan Sadiman, MP
NIP. 131 287 089

Anggota II



Dr. Ir. Sholeh Avivi, MSi
NIP. 132 288 239

MENGESAHKAN

Dekan,



Prof. Dr. Endang Budi Trisusilowati, MS
NIP. 130 531 982

Kata Pengantar

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat ALLAH SWT yang telah melimpahkan rahmat, taufik dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi dengan judul "Aktivitas Fitase Pada Beberapa Tingkat Perkecambahan Biji Kedelai (*Glycine max* L. Merr)".

Skripsi ini tidak akan terwujud apabila tidak ada ijin, bimbingan, dan pengarahan dari berbagai pihak, oleh karena itu pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Endang Budi Trisusilowati, MS selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Jember
2. Dr. Ir. Sri Hartatik, MS selaku Ketua Jurusan Budidaya Pertanian Universitas Jember
3. Kepala Pusat Penelitian Biologi Molekul Universitas Jember yang telah memberikan ijin kepada penulis untuk melaksanakan penelitian di Laboratorium Biologi Molekuler
4. Ir. Miswar, MSi selaku Dosen Wali dan Dosen Pembimbing Utama
5. Ir. Irwan Sadiman, MP selaku Dosen Pembimbing Anggota I
6. Dr. Ir. Sholeh Avivi, MSi selaku Dosen Pembimbing Anggota II

Saran dan kritik penulis harapkan untuk perbaikan skripsi ini selanjutnya.

Jember, Oktober 2004

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR SINGKATAN	ix
RINGKASAN	x
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	2
II. TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Perkecambahan Kedelai.....	3
2.2 Asam Fitat Pada Biji Kedelai.....	3
2.3 Fitase Pada Tanaman	4
2.4 Manfaat Fitase Saat Ini Dan Masa Datang.....	6
2.5 Peranan Pospor Inorganik pada Tanaman.....	7
2.6 Kandungan Total Protein Terlarut	8
2.7 Hipotesis.....	8
III. METODOLOGI PENELITIAN	9
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	9
3.2 Bahan dan Alat.....	9
3.3 Metode Penelitian	9
3.3.1 Pengecambahan Benih Kedelai.....	9
3.3.2 Ekstraksi Enzim	9
3.3.3 Analisis Enzim Fitase	10
3.3.4 Kandungan Protein Terlarut.....	10
3.3.5 Kandungan Protein Total.....	10

3.3.6 Pola Protein.....	12
3.3.7 Kandungan Pi Kedelai	12
3.3.8 Purifikasi Fitase	12
3.3.9 Karakter Kinetik Fitase	12
3.4 Parameter Pengamatan.....	12
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	13
4.1 Aktivitas Fitase	13
4.2 Kandungan Pospor Inorganik Biji Kedelai	14
4.3 Perbandingan Aktivitas Spesifik Fitase pada Berbagai Perlakuan	15
4.4 Pengukuran Total Protein Terlarut.....	17
4.5 Pengukuran V_{maks} dan K_m Fitase	18
4.6 Pola Protein Kedelai	19
V. SIMPULAN	21
DAFTAR PUSTAKA	22

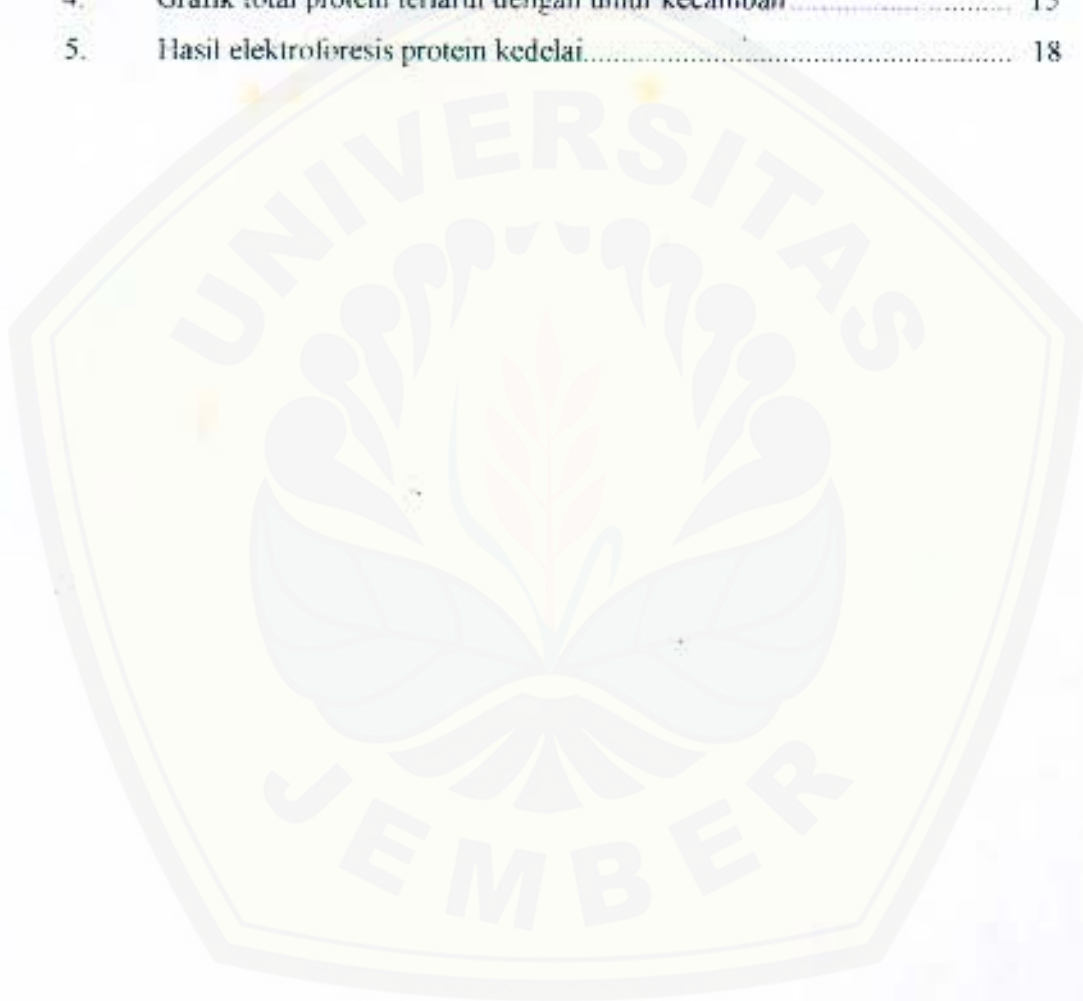
DAFTAR TABEL

Nomor	Judul	Halaman
1.	Tabel aktivitas spesifik fitase hasil purifikasi (pemurnian).....	14



DAFTAR GAMBAR

Nomor	Judul	Halaman
1.	Jalur biosintesis asam fitat.....	6
2.	Grafik aktivitas fitase dengan peningkatan umur kecambah.....	12
3.	Grafik kandungan phosphor inorganik biji dengan umur kecambah.....	13
4.	Grafik total protein terlarut dengan umur kecambah.....	15
5.	Hasil elektroforesis protom kedelai.....	18



DAFTAR SINGKATAN

BSA	: Bovine Serum Albumin
DEAE	: Diethylaminoethyl-Cellulosa
DTT	: DiThioThreitol
EDTA	: Ethylendiamine Tetra Acetic Acid
K _m	: Konstanta-Michelis-Menthen
P _i	: Phosphor Inorganik
PMSF	: Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride
SDSPAGE	: Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrilamide Gel Electroforesis
TPI	: Total Protein Terlarut
V maks	: Kecepatan maksimum

Eni Fidiyawati, NIM. 001510101233, Aktivitas Fitase Pada Beberapa Tingkat Perkecambahan Kedelai (*Glycine max* L. Merr) di bimbing oleh (Ir. Miswar, MSi sebagai DPU dan Ir. Irwan Sadiman, MP sebagai DPA)

RINGKASAN

Kedelai (*Glycine max* L. Merr) merupakan sumber pangan yang mengandung protein tinggi di dunia, oleh karena itu permintaan kedelai untuk sumber pangan dan pakan semakin meningkat (Golbitz, 2001) dalam Li and Burton (2002). Kedelai selain memiliki sisi positif (sumber protein dan mineral) juga memiliki sisi negatif, yaitu mengandung asam fitat yang merupakan senyawa yang mampu mengikat kation seperti P , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} dan lain-lain sehingga menyebabkan *flatensi*, yaitu protein dan mineral tidak dapat diserap oleh dinding usus manusia dan hewan monogastrik. Untuk dapat diserap mineral tersebut harus dilepaskan dari asam fitat oleh enzim fitase.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas fitase pada periode perkecambahan kedelai dalam menghidrolisis asam fitat untuk meningkatkan ketersediaan pospor dan mineral lainnya.

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Februari 2004 sampai Agustus 2004 di Laboratorium Biologi Molekul Universitas Jember, dengan menggunakan uji analisis laboratorium. Parameter yang diamati meliputi; aktivitas spesifik fitase, kandungan phosphor inorganik jaringan, pola protein, K_m dan V_{maks} fitase, dan protein total.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa aktivitas spesifik tertinggi fitase diperoleh pada saat umur perkecambahan 10 hari dan phosphor anorganik sebagai produk dari fitase memiliki jumlah tertinggi pada saat umur kecambah 10 hari, sedangkan protein total cenderung menurun dengan bertambahnya umur kecambah, dan setelah dipurifikasi diperoleh 3 kelompok fitase pada kedelai dan fitase 2 (aktivitas spesifik tertinggi) mempunyai nilai $K_m=0.221$ mM dan $V_{maks}=0.383$ ugPi/jam dan hasil elektroforesis terdapat protein untuk pertumbuhan dan potein yang disintesis selama proses perkecambahan. Fitase hasil purifikasi mempunyai aktivitas 11,89 kali lebih besar dibandingkan dengan fitase ekstrak kasar.

Kata Kunci: Fitase, Kedelai, Perkecambahan.



I. PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Kedelai (*Glycine max* L. Merr) merupakan sumber pangan yang mengandung protein tinggi di dunia, oleh karena itu permintaan kedelai untuk sumber pangan dan pakan semakin meningkat (Golbitz, 2001) dalam Li and Burton (2002). Kedelai selain memiliki sisi positif (sumber protein dan mineral) juga memiliki sisi negatif, yaitu mengandung asam fitat yang merupakan senyawa yang mampu mengikat kation seperti Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} dan lain-lain sehingga menyebabkan flutensi, yaitu protein dan mineral tidak dapat diserap oleh dinding usus manusia dan hewan monogastrik (Li and Burton, 2002).

Menurut Sajidan (2002) asam fitat yang terdapat pada biji kedelai mampu mengikat pospor sampai dengan 80%, sehingga dapat mengganggu perkecambahan kedelai. Untuk mengurangi kandungan asam fitat biji kedelai dapat dilakukan dengan cara perendaman dengan air panas (Health News, 2003). Tapi, cara tersebut tidak dapat digunakan apabila kedelai digunakan untuk tujuan pertanaman. Penggunaan enzim fitase untuk mengurangi kandungan asam fitat biji kacang-kacangan sedang dilakukan, enzim fitase merupakan enzim kunci yang dapat meningkatkan ketersediaan mineral dan pospor dalam biji dengan cara menghidrolisis asam fitat menjadi inositol dan orthoposfat bebas, sehingga pospor yang terikat asam fitat dapat lepas membentuk H_2PO_4 dan HPO_4^{2-} sehingga mampu digunakan oleh biji kedelai untuk aktivitas perkecambahan (Wilcox *et al.*, 2000).

Germinasi biji adalah cara yang relatif sederhana untuk mengurangi senyawa anti nutrisi, karena phytase meningkat aktivitasnya yang berarti menurunnya kandungan asam fitat biji, hal ini telah dilaporkan pada sejumlah biji termasuk kedelai, *dwarf bean*, biji selada, *triticale*, gandum dan *faba beans* (Mahajan and Dua, 1997). Enzim fitase saat ini menjadi salah satu enzim komersial dunia dan studi tentang enzim ini terus dilakukan mengingat adanya peranan yang penting enzim ini dalam mereduksi senyawa asam fitat dalam biji

kacang-kacangan dan peranannya dalam proses pertumbuhan tanaman dan sebagai *phytostimulan* (Lott *et al.*, 2000)

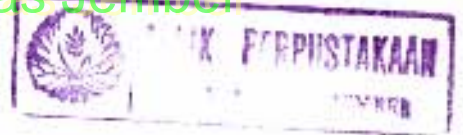
Manfaat penelitian ini adalah sebagai dasar acuan untuk produksi fitase dari kedelai untuk industri pangan dan pakan ternak.

1.2 Perumusan Permasalahan

Asam fitat yang terdapat pada biji kacang-kacangan termasuk kedelai menyebabkan anti nutrisi karena mengikat beberapa mineral seperti: P, Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺. Mineral tersebut terikat pada asam fitat, sehingga tidak dapat dimanfaatkan oleh manusia dan hewan monogastrik. Untuk dapat dimanfaatkan, mineral-mineral tersebut harus dilepaskan dari asam fitat. Fitase merupakan enzim yang mampu melepaskan mineral-mineral tersebut dari asam fitat. Enzim ini dapat dihasilkan dari kedelai yang sedang berkecambah. Untuk mendapatkan fitase maka perlu dicari periode perkecambahan yang tepat, sehingga dihasilkan fitase dalam jumlah besar dan aktivitas tinggi.

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas fitase pada periode perkecambahan kedelai terkait dengan kemampuan menghidrolisis phosphor dari asam fitat.



II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Perkecambahan Kedelai

Biji yang masak memiliki empat komponen secara fisiologis dan ekologi yang penting bagi kelangsungan hidupnya yaitu: kulit biji, embrio, cadangan makanan, enzim dan hormon yang diperlukan untuk mencerna cadangan makanan dan penyusun jaringan baru dalam persemaian selama perkecambahan. Perkecambahan meliputi peristiwa morfologis seperti: inisiasi dan pembesaran sel, imbibisi dan absorpsi air, dan munculnya embrio dan peristiwa fisiologis yaitu: hidrasi jaringan, absorpsi oksigen, pengaktifan enzim dan pencernaan, transpor molekul yang terhidrolisis ke sumbu embrio, peningkatan respirasi dan asimilasi (Gardner *et al.*, 1991).

Hasil asimilasi yang tersimpan dalam biji dimobilisasi dan dipindah ke jaringan meristem yang baru dan diaktifkan untuk perkembangan daun, batang, dan akar. Hasil asimilasi yang diproduksi oleh jaringan hijau ditraslokasikan ke seluruh tubuh tanaman untuk pertumbuhan, perkembangan, cadangan makanan dan pengolahan sel (Gardner *et al.*, 1991).

Germinasi atau perkecambahan kedelai merupakan pendekatan yang sederhana untuk mengurangi kandungan asam fitat. Proses perkecambahan tidak memerlukan energi dari luar yang intensif. Perkecambahan disertai dengan meningkatnya kadar fitase yang berakibat menurunnya asam fitat pada biji. Sistem ini tampak berhubungan periode metabolik pada biji, seperti pada pertumbuhan persemaian, asam fitat hilang dari jaringan karena adanya aktivitas fitase (Mahajan and Dua, 1997).

2.2 Asam Fitat pada Biji Kedelai

Mineral dan nutrisi pada sebagian besar biji disimpan dalam bentuk fitat, yang merupakan garam dari *myo-inositolhexaphosphoric acid* (asam fitat). Pada berat kering biji yang masak terdapat 1% sampai 8% asam fitat, yang mampu mengikat 90% P biji. Asam fitat selain mengikat pospor yang tersimpan dalam bentuk biji, juga akan mengikat ion Na^+ , K^+ dalam jumlah besar dan ion Ca^{2+} .

Mn^{2+} , Ba^{2+} , dan Fe^{2+} dalam jumlah lebih kecil. Fitat akan disimpan dalam bentuk protein tubuh, pada beberapa spesies tanaman dalam bentuk *proteinaceous matrix* dan diskret elektron-agregat yang disebut globoid atau kristal globoid. Spesies lainnya, fitat terbanyak (80%) ditemukan pada lapisan germinal dan sisanya di lapisan aleuron (Raboy *et al.*, 2000)

Fitat merupakan garam dari asam fitik (*myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakis [dihydrogen phosphate]*) (Cosgrove, 1996, 1980b; IUPAC and IUPAC-IUB, 1968), dan paling besar ditemukan pada sel eukariotik (Sasakawa *et al.*, 1995) dalam Lott *et al.* (2000). Struktur molekul asam fitat diberikan oleh Johnson and Tate (1969), yang memiliki 12 atom hidrogen (dan 6 gugus phosphor) yang tidak larut air (Brown *et al.*, 1961). Fitat merupakan *chelator* (pengikat) yang kuat pada kation polivalen dan ikatan paling kuat terjadi pada kation valensi satu (Lott *et al.*, 2000). Fitat kemungkinan hanya akan disintesis pada sel atau jaringan penyimpan.

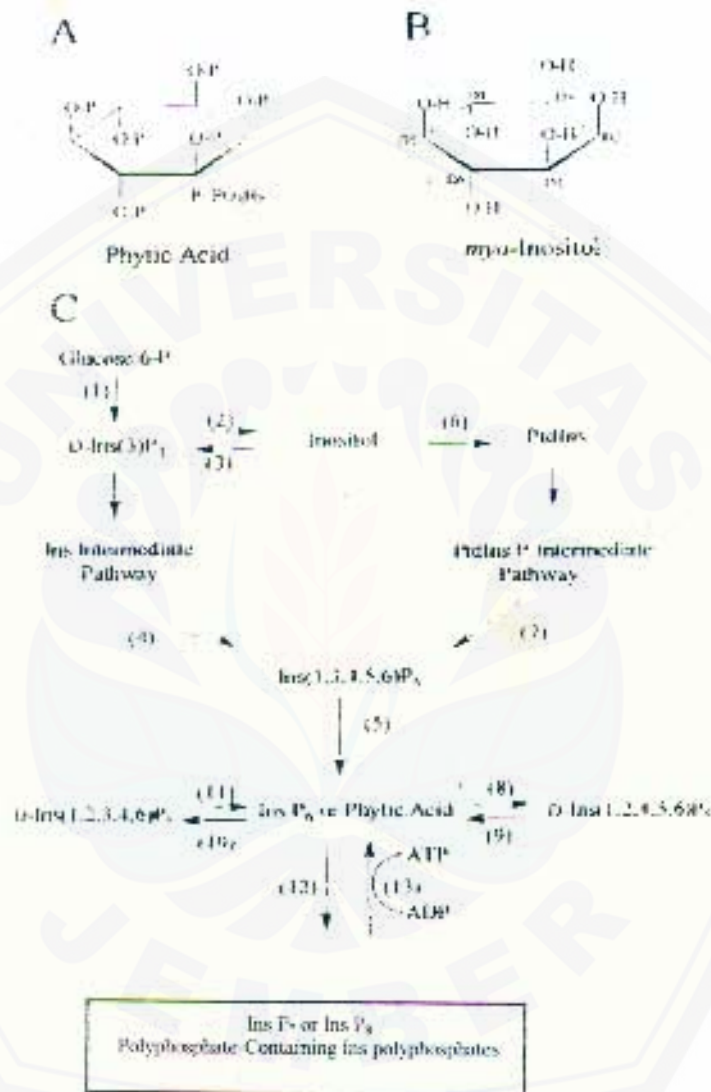
Struktur asam fitat memungkinkan dapat berikatan dengan mineral, protein, dan pati, dan menghasilkan efek merugikan. Fitat dapat diaplikasikan dalam bidang medis dan industri, tetapi dapat menyebabkan pencemaran phosphor pada air dan tanah (Oatway *et al.*, 2001).

2.3 Fitase pada Tanaman

Fitase adalah sekelompok spesifik fosfatase yang diperlukan untuk memulai pembebasan pospor dari fitat (Han *et al.*, 1999), dan merupakan enzim alam yang ditemukan pada biji tanaman dan mikroorganisme (Ullah, 1988) dalam Cavalcanti and Behnke (2004).

Waktu biji berkecambah, hidrolisis fitat menyebabkan penyediaan nutrisi untuk pertumbuhan benih, deposporilasi fitat menjadi rangkaian inositol dan phosphor inorganik dikatalis oleh fitase. Fitase telah ditemukan pada sejumlah biji termasuk kedelai, *dwarf bean*, biji selada, *triticale*, gandum, dan *faba beans* dan sifat kinetiknya juga telah diketahui, dan kultivar yang berbeda memiliki karakteristik yang berbeda (Buchanan *et al.*, 2000). Pada saat biji kedelai berkecambah peningkatan aktivitas fitase yang nyata secara bersamaan diikuti

dengan penurunan asam fitat, dengan aktivitas fitase maksimal dicapai pada usia kurang dari 10 hari perkecambahan (Hegeman *et al.*, 2001).



Gambar 1. Jalur biosintesis asam fitat (ket: Struktur asam fitat (A); Asam fitat yang telah terhidrolisis fitase menjadi *myo*-inositol (B); Proses hidrolisis P dari asam fitat pada jagung yang melibatkan enzim-enzim, yaitu: (1) D-Ins (3)- Pi synthase; (2) D-Ins 3-phosphatase; (3) D-Ins 3-kinase; (4) Ins P- or polyP kinases; (5) Ins (1,3,4,5,6) P₅ 2-kinase or phytic acid; (6) PtdIns synthase; (7) PtdIns and PtdIns P kinases; (8) D-Ins (1,2,3,4,5,6) P₆ 3-Phosphatase; (9) D-Ins (1,2,4,5,6) P₅ 3-kinase; (10) D-Ins (1,2,3,4,6) P₅ 5-kinase; (12) pyrophosphate-forming Ins P₆

kinases; (13) pyrophosphate-containing Ins PolyP-ADP phosphotransferase Raboy *et al.*, 2000)

Fitase (*myo-inositol hexaphosphate phosphohydrolase*) mengkatalisis hidrolisis asam fitik [*myo-inositol (1,2,3,4,5,6) hexakisphosphate*] umumnya untuk penyimpanan phosphor pada biji dan pollen (Reddy *et al.*, 1982). Beberapa seri *myo-inositol* yang mengandung ester phosphat dan asam fosforik yang rendah. Dua tipe fitase telah diketahui, yaitu: 3 fitase (EC 3.1.3.8) dan 6 fitase (EC 3.1.3.26) yang mengindikasikan awal pemutusan termudah pada ikatan pospodiester (Irving, 1980; Nayini *and* Markakis, 1986) dalam Houde *et al.*, (1990).

Fitase yang telah ditemukan sudah diketahui aktivitasnya, seperti: 6 fitase menghidrolisis rantai pospat ester dari *inositol* pada rangkai dasar fitat (Tomlison *and* Ballau, 1962), dan aktivitasnya dilaporkan pada beberapa tanaman sereal (Chang, 1967) kacang-kacangan (Beal *and* Mehta, 1985; Eskin *and* Weibe, 1983) dan biji minyak (Iolas *and* Markakis, 1977) dalam Houde *et al.* (1990).

2.4 Manfaat Fitase Saat Ini Dan Masa Datang

Fitase sebagai salah satu enzim komersial dunia saat ini banyak digunakan. Saat ini fitase banyak dimanfaatkan untuk mengurangi faktor antinutrisi pada ransum ternak yang diberi makanan dari tanaman, terutama untuk mengurangi polusi phosphor. Bidang industri fitase banyak digunakan untuk produk makanan bayi dan anak terutama produk susu kedelai, karena banyak mengandung asam fitat. Bidang kesehatan fitase banyak digunakan sebagai zat aditif untuk mengurangi asam urat dan kolesterol, karena kemampuan asam fitat untuk mengikat mineral, protein, lemak, termasuk kolesterol (Sajidan, 2002).

Fitase dimasa datang kemungkinan akan sangat banyak dimanfaatkan untuk industri pakan dan pangan, terutama untuk tujuan peningkatan nilai gizi yang terdapat pada makanan (Mahajan *and* Dua, 1998). Fitase saat ini tidak hanya dihasilkan dari mikroorganisme, tetapi sudah diupayakan untuk dapat memperoleh fitase dari tanaman. Upaya mengisolasi fitase dari tanaman saat ini sedang

digalakkan, terutama dari tanaman kacang-kacangan dan tanaman sereal, dikarenakan fitase dari tanaman lebih aman digunakan daripada dari mikroorganisme.

2.5 Peranan Phosphor Inorganik pada Tanaman

Jumlah kecukupan phosphor pada tanaman menjadi pembatas pertumbuhan dan perkembangan pada semua organisme untuk beberapa fungsi seperti penyusun makromolekular, energi pertumbuhan, dan regulasi metabolisme, kebutuhan pospor meningkat drastis ketika tanaman dalam periode pembentukan dan pertumbuhan sel, seperti pada saat berkecambah (Hegemen *et al.*, 2001). Wilcox *et al.* (2000) mengatakan bahwa phosphor dalam biji kedelai disimpan dalam bentuk asam fitat dan phosphor yang terikat asam fitat merupakan nutrisi yang tidak tersedia untuk cadangan makanan kedelai.

Phosphor adalah salah satu unsur makro terpenting pada tanaman, kandungan Phosphor pada berat kering tanaman dapat mencapai 0,2%. Ini adalah komponen molekul kunci untuk asam nukleat, phospholipid, dan ATP. Tanaman tidak dapat tumbuh tanpa suplai nutrisi ini. Phosphor dalam bentuk inorganik dipakai sebagai molekul kunci untuk mengontrol reaksi enzim dan regulasi pada siklus metabolisme. Phosphor dalam biji terdiri dari dua bentuk, yaitu: phosphor bebas yang dapat digunakan untuk pembentuk tenaga dalam kegiatan metabolisme sel dan ATP, serta sebagai katalisis dan kofaktor enzim untuk perkecambahan (Scachtman *et al.*, 1998).

Tanaman tidak dapat mengasimilasi komponen Phosphor organik secara langsung dan hanya dapat diserap setelah komponennya mengalami mineralisasi menjadi anion ortopospat ($H_2PO_4^-$ dan HPO_4^{2-}). Perananan secara fisiologis fitase pada biji adalah dalam pelepasan phosphor anorganik dari fitat. Proporsi terbesar dari phosphor anorganik yang terhidrolisis digabung untuk membentuk asam nukleat (Ergle *and* Guin, 1959), dan energi untuk berbagai reaksi tingkat sel (Palmino *and* Juliano, 1972), serta sebagai substrat untuk reaksi *phospholipid transferase*, penyediaan energi, dan bahan penyusun diferensiasi sel yang cepat (Houde *et al.*, 1990).

2.6 Kandungan Total Protein Terlarut

Protein merupakan cadangan N bagi pertumbuhan semai dan termasuk polimer dari asam amino yang dihubungkan dengan ikatan peptida. Dua puluh asam amino yang membentuk protein terdapat di alam, sebagian atau seluruhnya dapat terangkai dengan urutan yang bervariasi untuk membentuk molekul protein yang berbeda.

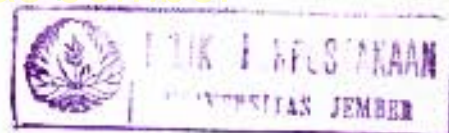
Komposisi asam amino pembentuk cadangan makanan biji, berbeda dari cadangan makanan yang berada dalam jaringan vegetatif. Protein biji biasanya kekurangan satu atau lebih dari tiga asam amino esensial (yang diperlukan dalam makanan hewan monogastrik) dan manusia (Gardner dkk., 1991).

Protein dalam biji yang sedang berkecambah disimpan dalam dua bentuk, yaitu: protein yang tidak tersedia dan protein yang tersedia untuk aktivitas perkecambahan. Protein yang tidak tersedia biasanya disimpan dalam bentuk protein tubuh dan protein yang tersedia dalam bentuk protein terlarut. Protein terlarut ini akan digunakan oleh biji untuk kegiatan perkecambahan (Konietzny *et al.*, 1994).

Total protein terlarut diukur untuk mengetahui aktivitas spesifik fitase pada saat kedelai berkecambah, seandkan protein total kedelai diukur sebagai langkah awal untuk penentuan pola protein. Pola protein diukur untuk mengetahui pola protein dari fitase.

2.7 Hipotesis

Bertambahnya umur kecambah akan meningkatkan aktivitas fitase dan ketersediaan phosphor inorganik biji.



III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Februari 2004 sampai Agustus 2004 di Laboratorium Biologi Molekul Universitas Jember.

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain: tabung reaksi, mikropipet, sentrifus, spektrofotometer, inkubator waterbath, gelas ukur, dan lain-lain.

Bahan yang digunakan adalah benih kedelai variats Bromo, 15% TCA, HCL, asam fitat, dan bahan-bahan kimia lain dengan kualifikasi untuk analisis.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Pengecambahan benih kedelai

Benih kedelai varietas bromo dikecambalkan pada kapas basah di bak pengecambah dan diambil kotiledonnya dengan interval 2,4,6,8,10,12,dan 14 hari dan benih umur 0 hari sebagai kontrol, sampel disimpan pada suhu -20°C .

3.3.2 Ekstraksi Enzim

Fitase diekstraksi dengan metode Goel and Sahrma (1979). Kotiledon kedelai sebanyak 2-3 gram digerus dengan *mortar sumprer* dingin ditambah dengan pasir kuarsa sampai halus ditambah 5 mL buffer ekstraksi (100 mM Naasetat pH 5,5; 20 mM CaCl_2 ; 1 μM DTT, dan 0,5 μM PMSF). Hasil ekstraksi disentrifus selama 15 menit pada suhu 4°C dengan kecepatan 12.000 rpm. Supernatan disimpan pada suhu -20°C .

3.3.3 Analisis Enzim Fitase

Supernatan dari hasil ekstraksi enzim kemudian ditentukan aktivitas fitase dengan menggunakan metode Eeckhout and De Paep (1994). 200 μM substrat (0,5 mM asam fitat dalam 100 mM sodium asetat) diinkubasi pada suhu

50°C selama 5 menit, ditambah 100 µl. fitase dengan interval 30 detik dan diinkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit, kemudian ditambah 15% TCA 300µl. dengan interval waktu 30 detik dan dihomogenatkan dan disentrifus selama 5 menit dan diambil sebanyak 350µL dan ditambah 1 mL color reagent (6N H₂SO₄; 2,5% Ammonium heptamolibdat; 10% asam askorbat; H₂O dengan perbandingan 1:1:1:2) dan diinkubasi pada suhu 50°C selama 20 menit dan diukur arbsorbannya dengan spektrofotometer pada $\lambda = 690$ nm.

3.3.4 Kandungan Protein Terlarut

Kandungan protein diukur dengan menggunakan metode Bradford (Bradford, 1976). Masing-masing sampel fitase sebanyak 10 µL ditambah 1 mL larutan Bradford didiamkan selama 15 menit pada suhu ruang dan diukur absorbannya pada spektrofotometer dengan $\lambda=595$ nm. Hasil pembacaan dibandingkan dengan standard BSA 1 mg/mL. (Bovine Serum Albumin) untuk mengetahui kandungan protein.

3.3.5 Penentuan Protein Total

Penentuan protein total diukur dengan metode Raboy *et al.* (1984). Sampel kotiledon digerus ditambah 3 mL buffer ekstraksi protein total (0.03 M Tris-HCL ph 8.0 dan 10 mm Merkaptocetanol) disentrifus selama 15 menit dengan kecepatan 12.000 rpm kemudian supernatannya diambil sebanyak 10µL ditambah 1 mL reagent Bradford (Bradford, 1976) didiamkan selama 15 menit pada suhu ruang kemudian diukur absorbannya pada $\lambda = 595$ nm dan dibandingkan dengan standard BSA 1mg/mL.

3.3.6 Pola Protein

Pola protein ditentukan dengan metode elektroforesis. Sampel protein total yang telah diketahui jumlahnya dipisahkan secara elektroforesis dengan menggunakan SDS-PAGE (*Sodium Dodesil Sulfate Polyacrylamide Gel*) Elektroforesis pada total protein yang sama kemudian dicat dengan 40%

methanol, 10% asam asetat dan 1% CTBB selama 15 menit dan dicuci dengan 40% methanol dan 10 % asam asetat sampai pola protein terlihat.

3.2.7 Kandungan Pi Kedelai

Penentuan kandungan Pi kedelai dengan metode Ruboy *et al.* (1994) dalam Hitz *et al.* (2002). Sampel kotiledon kedelai digerus dan ditambah 3 mL 0,4 N HCL, disentrifus selama 15 menit dengan kecepatan 12.000 rpm, supernatan diambil dan disimpan selama 24 jam pada *cold chamber*, kemudian sampel diambil sebanyak 50:75:100 μ L ditambah H₂O sampai volume 500 μ L dan diberi 500 μ L colour reagen dan diinkubasi pada suhu 50°C selama 20 menit kemudian diukur absorbannya pada λ -690 nm dan dibandingkan dengan standar Pi (larutan 10 mM NaH₂PO₄).

3.2.8 Purifikasi Fitase

Sampel enzim yang telah diketahui aktivitas tertinggi kemudian dipurifikasi dengan metode Heinonen *and* Lahti (1981) dalam Hegeman *and* Grabau (2002). Tahap I sampel enzim dipresipitasi dengan ammonium sulfat 0-50% kemudian disentrifus 20 menit pada kecepatan 10.000 rpm diambil supernatannya, kemudian dipresipitasi kembali dengan ammonium sulfat 50%-80% disentrifuse selama 20 menit 10.000 rpm diambil peletnya dan diencerkan dengan 100 mM Na-asetat pH 5,5 sampai volume 10 mL, kemudian dimasukkan dalam kolom DEAE-Cellulose untuk fraksinasi. Hasil fraksinasi diukur absorbannya pada spektrofotometer pada λ 280 nm, nilai absorban tertinggi diukur aktivitasnya kembali untuk pengukuran Km dan Vmax.

3.3.9 Karakter Kinetik Fitase

Karakter kinetik fitase yang diukur adalah nilai Km dan Vmaks fitase dengan menggunakan persamaan Lineweaver-Burk, untuk mendapatkan nilai Km dan Vmaks, fitase direaksikan dengan substrat pada konsentrasi yang berbeda.



V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian diperoleh kesimpulan aktivitas fitase dan kandungan phosphor inorganik kedelai tertinggi pada umur kecambah 10 hari, sedangkan kandungan protein terlarut menurun sampai umur kecambah 12 hari, aktivitas fitase 2 mengalami peningkatan 11,89 kali setelah dipurifikasi daripada *crude ekstrak*.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang fitase sehingga didapat 6 jenis enzim fitase pada kedelai.

Daftar Pustaka

- Asmar, F. 1997. Variation in Activity of Root Extracellular Phytase between Genotypes of Barley. **Plant and Soil**. Vol. 195: 61-64.
- Bradford, M.M. 1976. A Rapid Sensitive Method for The Quantition of Micogram Quantitive of Protein Utilizing The Principle of Protein Dye Binding. **Anal. Biochem**. 72: 284-254.
- Brearley, C. A. and D. E. Hanke. 2000. Metabolic Relation of Inositol 3,4,5,6-Tetrakisphosphate Revealed by Cell Permeabilization. Identification of Inositol 3,4,5,6-Tetrakisphosphate 1-Kinase and Inositol 3,4,5,6-Tetrakisphosphate Phosphatase Activities in Mesophyll Cells. **Plant Physiology**. Vol. 122:1209-1216.
- Buchanan, B. B.; W. Gruissem; and R. L. Jones. 2000. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American society of Plant Physiology.
- Fernandez, M.; P. Aranda; M. L. Jurado; M. A. G. Fuentes; and G. Urbano. 1997. Bioavailability of Phytic Acid Phosphorus in Processed *Vicia faba* L. Var. Major. **J. Agric. Food Chem**. Vol. 45:4367-4371.
- Gardner F. P.; R. B. Pearce, R. L. Mitchell. 1991. **Fisiologi Tanaman Budidaya**. UI-Press, Jakarta.
- Hasbullah. 2002. **Teknologi Tepat Guna Agroindustri Kecil di Sumatera Barat**. Dewan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Sumatra Barat. Padang.
- Han, Y.; D. B. Wilson; and X. G. Lei. 1999. Expression of an *Aspergillus niger* Phytase Gene (phy A) in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Biology**. Vol. 65: 1915-1918.
- Healthnews. 2003. Ada Zat Menghadang Gizi. <http://www.infoschat/intisari/healthnews.com>. diakses 4 Oktober 2003.
- Hegeman, C. E. 2001. A Novel Phytase With Sequence Similiarity to Purple Acid Phosphatase is Expressed in Cotyledons Of Germinating Soybean Seddlings. **Plant Physiology**. Vol. 128:650-660.
- Hitz, W. D. ; T. J. Carlson; P. S. Kerr; and S. A. Sebastian. 2002. Biochemical and Molecular Characterization of a Mutation That Confers a Decreased Raffinosaccharide and Phytic Acid Phenotype on Soybean Seed. **Plant Physiology**. Vol. 128: 650-660.

- Houde, R. L.; I. Alli; and S. Kermasha. 1990. Purification and Characterization of Canola Seed (*Brassica* sp) Phytase. **J. Agric. Food. Chem.** Vol. 14:331-351
- Konietzny, U.; R. Greiner; and K. D. Jany. 1994. Purification and Characterization of a Phytase From Spelt. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 18:165-183.
- Li, M.; M. Osaki; I. M. rao; and T. Todano. 1997. Secretion of Phytase from the Root of Several Plant Under Phosphorus-Deficient Conditions. **Plant and Soil.** Vol. 195:161-169.
- Liu, J.; D. R. Ledoux; T. L. Veum. 1997. In Vitro Procedure for Predicting the Enzymatic Dephosphorylation of Phytase in Corn-Soybean Meal Diets for Growing Swine. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 45:2612-2617
- Lott, J. N. A.; I. Ockenden; V. Raboy; and G. D. Batten. 2000. Phytic Acid and Phosphorus in Crop Seed and Fruits: a Global Estimate. **Seed Science Research.** Vol. 10:11-33.
- Mahajan, A. and S. Dua. 1997. Nonchemical Approach for Reducing Antinutritional Factors in Rapeseed (*Brassica campestris* Var. Toria) and Characterization of Enzyme Phytase. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 45:2504-2508.
- Raboy, V.; P. F. Garbasi; K. A. Young; S. D. Stoneberg; S. G. Pickett; A. T. Bauman; P. P. N. Murthy; W. F. Sheridan; and D. S. Friti. 2000. Origin and Seed Phenotype of Maize low phytic acid 1-1 and low phytic acid 2-1. **Plant Physiology.** Vol. 124:355-368.
- Ricardson, A. E.; P. A. Hadobas; J. E. Hayes; C. P. O. Hara; and R. J. Simpson. 2001. Utilization of phosphorus by Pastures Plants Supplied with myo-inositol Hexaphosphate is Enhanced by the Presence of Soil Micro-Organism. **Plant and Soil.** Vol. 229:47-56.
- Schachtman, D. P.; R. J. Reid; and S. M. Ayling. 1998. Phosphorus Uptake by Plant: From Soil to Cell. **Plant Physiology.** Vol. 116:447-453.
- Sutopo, L. 1985. **Teknologi Benih.** Universitas Brawijaya, Malang.
- Viveros, A.; C. Canteno; A. Brenes; R. Canales; and A. Lozano. 2000. Phytase and Acid Phosphatase Activities in Plant Feedstuffs. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 48:4009-4013
- Yoshida, K. T.; T. Wada; H. Koyama; R. M. Fukuoka; and S. Naitoh. 1999. Temporal and Spatial Patterns of Accumulation of the Transcript of myo-

Inositol-1- Phosphate Synthase and Phytin Containing Particles During Seed Development in Rice. **Plant Physiology**. Vol. 119: 65-72.

