

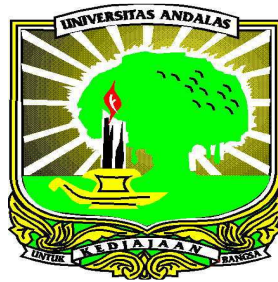
**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI PENGHASIL  
ENZIM FITASE DARI SUMBER AIR PANAS RIMBO PANTI  
PASAMAN**

**SKRIPSI**

Oleh :

**RULI YONIPA SIREGAR**

**04 162 029**



**FAKULTAS PETERNAKAN  
UNIVERSITAS ANDALAS  
PADANG, 2010**

## **Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penghasil Fitase Dari Sumber Air Panas Rimbo Panti Pasaman**

Ruli Yonipa Siregar, dibawah bimbingan  
Dr. Ir. Neni Gusmanizar, MS dan Prof. Dr. Ir. Yetti Marlinda, MS  
Jurusan Nutrisi dan Makanan Ternak Fakultas Peternakan  
Universitas Andalas, Padang 2010

### **Abstrak:**

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi enzim fitase dihasilkan oleh bakteri yang diisolasi dari sumber air panas Rimbo Panti Pasaman. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Industri Pakan dan Mikrobiologi FMIPA. Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan tiga kali ulangan pada setiap perlakuan. Hasil penelitian diperoleh 4 isolat bakteri dan 3 isolat bakteri yang mempunyai kemampuan mendegradasi asam fitat yaitu N1, N3, dan N4. Namun setelah dilakukan skrining isolat N4 mempunyai kemampuan mendegradasi asam fitat dengan aktivitas enzim tertinggi (39.8 mL/mnt). Bakteri isolat N4 adalah gram-positif, berspora dan berbentuk batang. Selanjutnya isolat N4 ditumbuhkan pada medium cair untuk memproduksi enzim fitase. Enzim fitase yang dihasilkan kemudian dikarakterisasi berdasarkan pH dan temperatur optimum serta stabilitas. Hasil penelitian menunjukkan bahwa enzim fitase yang dihasilkan mempunyai pH optimum 6-7.5, sedangkan temperatur optimum diperoleh 90<sup>0</sup>C dan temperatur stabilitasnya 30-90<sup>0</sup>C. Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan bahwa enzim fitase yang dihasilkan isolat N4 adalah termostabil yang dapat diaplikasikan pada industri pakan ternak.

Kata kunci: Isolasi; karakterisasi; bakteri; fitase

# 1. PENDAHULUAN

## A. Latar Belakang

Gandum dan biji-bijian merupakan bahan pakan asal tanaman dimana lebih dari 90% hasil panen dunia merupakan bahan pakan utama bagi ternak monogastrik. Pada umumnya biji-bijian mengandung senyawa fitat (*Myo-inositol Hexakisphosphat*) yang dapat mengikat mineral fosfor sehingga tidak dapat dimanfaatkan oleh ternak terutama ternak monogastrik.

Ternak monogastrik seperti babi dan unggas serta ikan tidak mampu mendegradasi senyawa fitat yang mengikat fosfor karena tidak ada enzim fitase pada alat pencernaan menyebabkan rendahnya ketersediaan unsur fospat bagi ternak. Untuk memenuhi kebutuhan fosfor ternak maka kedalam ransum perlu ditambahkan mineral fospat inorganik. Fospat yang tidak dicerna oleh ternak akan dikeluarkan melalui feces sehingga dapat menyebabkan terjadinya pencemaran air sungai, danau, dan tanah. Kelebihan konsentrasi fospat pada lingkungan dapat menyebabkan *eutrophication* yaitu terjadinya pencemaran perairan yang akan menyuburkan alga beracun dan dapat membunuh ikan.

Beberapa peneliti telah mengisolasi thermo fitase dari bakteri dan kapang yang berasal dari luar Indonesia. Jenis kapang penghasil thermoenzim fitase adalah *Aspergillus ficuum* (Ullah, 1988), *Neurospora crassa* (Xiao-Ling *et al.*, 2006). Enzim fitase yang ditemukan pada bakteri seperti *Pseudomonas sp* (Irving dan Cosgrove, 1971), *Bacillus subtilis* (Powar dan Jagannathan, 1982), *Klebsiella sp* (Shah dan Parekh, 1990), *B. subtilis*(natto) (Shimizu, 1992), *Esherichia coli* ( Greiner *et al.*, 1993), *Enterobacter sp 4* (Yoon *et al.*, 1996) dan *Bacillus sp* (Choi *et al.*, 2001; Kerovuo *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998). Namun dalam penggunaan enzim ini terkendala pada tidak tahannya enzim fitase

terhadap pemanasan selama proses pelleting ransum yang dapat mencapai suhu  $>85^{\circ}\text{C}$  (Kirkpinar dan Basmacioglu, 2006). Peningkatan temperatur pada proses pelleting ini dapat mengakibatkan kerusakan aktivitas enzim fitase yang dicampurkan ke dalam ransum.

Untuk mendapatkan enzim yang stabil terhadap suhu tinggi perlu diisolasi mikroorganisme penghasil enzim fitase seperti pada sumber air panas. Oleh karena belum adanya informasi mengenai bakteri termofilik penghasil enzim fitase pada sumber air panas di Rimbo Panti Kabupaten Pasaman Timur Propinsi Sumatra Barat maka dilakukan penelitian untuk mengisolasi dan karakteristik bakteri termofilik lokal baru penghasil enzim fitase yang berasal dari sumber air panas. Selanjutnya diharapkan dapat lebih sesuai digunakan terutama pada industri pakan ternak non-ruminansia.

## **B. Perumusan Masalah**

Permasalahan dalam penelitian ini ialah belum ditemukan adanya mikroorganisme lokal penghasil enzim fitase yang stabil pada pH rendah dan temperatur tinggi sebagai feed aditif.

## **C. Tujuan dan Manfaat Penelitian**

### **1. Tujuan**

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan karakteristik bakteri penghasil enzim fitase baru yang stabil pada temperatur tinggi dari sumber air panas.

### **2. Manfaat Penelitian**

Adapun manfaat penelitian ini adalah memberikan informasi kepada peneliti untuk penelitian selanjutnya dalam memproduksi enzim fitase yang stabil pada temperatur tinggi untuk meningkatkan produksi ternak dan pengembangan industri pakan ternak.

#### **D. Hipotesis Penelitian**

Hipotesis Penelitian ini adalah mengisolasi dan karakterisasi bakteri penghasil enzim fitase dari sumber air panas akan memperoleh isolat bakteri penghasil enzim fitase yang tahan terhadap temperatur tinggi dan pH rendah.

## **V. KESIMPULAN**

### **A. Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa dari keempat isolat yang didapat dari isolasi bakteri penghasil enzim fitase berasal dari sumber air panas Rimbo Panti Pasaman, bakteri isolat 4 merupakan isolat terbaik yang memiliki aktivitas enzim tertinggi.

Bakteri isolat 4 merupakan bakteri gram-positif, berspora dan berbentuk batang. Kondisi optimum untuk aktivitas enzim fitase bakteri isolat 4 adalah pada temperatur 90°C, sedangkan pH optimum untuk aktivitas enzim sesuai adalah pH 6-7.5 dan stabil pada temperatur 30-90 °C.

### **B. Saran**

Untuk penelitian selanjutnya agar dilakukan karakterisasi dan pemurnian enzim fitase dari bakteri isolat 4.

## DAFTAR PUSTAKA

- Amano, P. 1995. Novel Phytase. Japan Pat. 07067635.
- Al Asheh, S. and Z. Duvnjak. 1994. Characteristics of phytase produced by *Aspergillus carbonarius* NRC 401121 in canola meal. *Acta Biotechnology* 14 : 223-233..
- Brock, T. D. 1974. *Biology of Microorganismes*. 2<sup>nd</sup>. Ed. Prentice Hall, Inc Englewood clift, New Jersey.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 : 248-254.
- Buchana, R. E. and N. E. Gibsons. 1974. *Bergeys manual of determinative bacteriology*. The Williams and Walkins Company, Baltimore.
- Cao, L., W. Wang, C. Yang, J. Diana, A. Yakupitiyage, Z. Luo, and D. Li. 2007. Application of Microbial Phytase in Fish Feed. *Journal of Enzyme and Microbial Tecnology* 40: 497-507.
- Choi, Y. M., H. J Suh, and J. M Kim. 2001. Purification and properties of extracellular phytase from *Bacillus* sp. KHU-10. *Journal of Protein Chemistry* 20: 287-292.
- Chen, M. Dunham and C. Christianson. 2005. Phosphate Assay. [http // www. Genomics. Priceton.edu/duham .com](http://www.Genomics.Priceton.edu/duham.com). diakses pada tanggal 10 Desember 2008. 14.00 WIB.
- Craxton, A., J. J. Caffrey, W. Burkhart, S. T. Safrany, and S. B. Shears. 1997. Molecular cloning and expression of a rat hepatic multiple inositol polyphosphate phosphatase. *Biochemistry Journal* 328 : 75-81.
- Delucca, A. J., C. Dischinger and A. H. J. Ullah. 1992. Identification of a phytase from *Citrobacter freundii*. Abstrac. Gen. Meeting. American. Society force. Microbiology. 92 Meet. 385.
- Delfita, R. 2008. Isolasi dan karakteristik mikroflora endofitik penghasil enzim fitase dari tanaman kedelai. Tesis Pascasarjana Universitas Andalas, Padang.
- Edwards, H. M. JR. 1993. Dietary 1, 25-dihydroxycholecalciferol supplementation increases natural phytate phosphorus utilization in chickens. *Journal of Nutrition* 123: 567-573.
- Elsorra E. Idriss., M. Oliwia, F. Abdelazim, R. Kristin, G. Ralf, B. Helmut, R. Thomas, and B. Rainer. 2002. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect . *Microbiology* 148: 2097–2109.
- Fardiaz, S. 1989. *Penuntun praktikum mikrobiologi pangan*. Penerbit IPB, Bogor.

- Friedman, S. M. 1992. Termofilik Microorganisme. In Encyclopedia of Mikrobiology. Hunter College of city Univercity of New York. By academic Press. Inc. New York.
- Freund, W. D., G. Mayr, W. Tielz, dan J. E. Schultz. 1992. Metabolic of inosol phosphate in the protozoan, paramecium. Europe Journal of Biochemistry. 207 : 359-367.
- Gargova, S., Z. Roshkova, and G. Vancheva. 1997. Screening of fungi for phytase Production. Biotechnology Techniques 11(4):221-224.
- Garrett, J.B., K. A. Kretz, E. O. Donoghue, J. Kerovuo, W. Kim, N. R. Barton, G. P. Hazlewood, J. M. Short, D. E. Robertson, and K. A. Gray. 2004. Enhancing the thermal tolerance and gastric performance of a microbial phytase for use as a phosphate-mobilizing monogastric-feed supplement. Applied and Environmental Microbiology 70: 3041-3046.
- Gibson, D. M. and A. H. J. Ullah. 1988. Purification and characterization of phytase from cotyledons of germinating soybean seeds. Archives and Biochemistry Biophysics 260: 503-513.
- Ghareib, M. 1990. Biosynthesis, purification, and some properties of extracellular phytase from *Aspergillus carneus*. Acta Microbiology Hung 37 : 412-418.
- Greaves, M. P., G. Anderson, and D. M. Webley. 1967. The hydrolysis of inositol phosphates by *Aerobacter aerogenes*. Biochim. Biophys. Acta 132 : 412-418.
- Greiner, R., U. Konietzny, and K. D. Jany. 1993. Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. Archives Biochemistry and Biophysics 303: 107-113.
- Greiner, R., E. Haller, U. Konietzny, and K. D. Jany. 1997. Purification and characterization of a phytase from *Klebsiella terrigena*. Archives Biochemistry and Biophysics 341: 201-206.
- Greiner, R. and U. Konietzny. 2006. Phytase for food aplication. Food Tecnology and Biotecnology 44: 201-206.
- Gulati, H.K., B. S. Chadha, and H.S. Saini. 2007. Production of feed enzyme (phytase ang plant cell wall hydrolyzing enzyme) by *Mucor indicus* MTCC 6333: Purification and characterization of phytase. *Folia microbiologica* 52 (5):491-497.
- Gusmanizar, N., J. Suriani, Z. Asrah, M. A. Syed, J. Ramli, and M.Y. Shukor. 2004. Screening and isolation of *acrylamide*-degrading bacteria from Malaysian soils. Malaysian Journal of Biochemistry and Molecular Biology 9: 73.
- Hara, A., S. Ebina, A. Kondo, and T. Funaguma. 1985. A new type of phytase from pollen of *Typha latifolia* L. Agriculture. Biological Chemistry 49: 3539-3544.
- Hayward, C.A. 2007. Phosphate Assay Kit. [http // www.bioassaysys.com](http://www.bioassaysys.com) diakses pada tanggal 28 Januari 2009. 19.00 WIB.



- Irving, G. C. J. and D. J. Cosgrove. 1971. Inositol phosphate phosphatase of microbial origin. Observations on the nature of the active center of a bacterial (*Pseudomonas* sp.) phytase. Australian Journal Biological Science 24 : 1559-1564.
- IUPAC-IUB (Commission on Biochemical Nomenclature). 1977. Nomenclature of phosphorus containing compounds of biochemical importance. Eur. Journal Biochemistry **79** : 1-9.
- Jareonkitmongol, S., M. Ohya, R. Watanabe, H. Takagi, and S. Nakamori. 1997. Partial purification of phytase from a soil isolate bacterium, *Klebsiella oxytoca* MO-3. Journal Fermentation and Bioengineering 83: 393-394.
- Jongbloed, A. W. and P. A. Kemme. 1990. Effect of pelleting mixed feeds on phytase activity and the apparent absorbability of phosphorus and calcium in pigs. Animal Feed Science and Technology 28: 233-242.
- Kerovuo, J.; M. Lauraeus, P. Nurminen, N. Kalkinen, and J. Apajalahti. 1998. Isolation, characterization, molecular gene cloning and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. Applied and Environmental Microbiology 64: 2079-2085.
- Kim, Y. O., M. J Kim, K. S. Bae, J. H. Yu, and T. K. Oh. 1998a. Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DS11. Enzyme and Microbial Technology 22: 2-7.
- Kim, Y. O., M. J Kim, K. S. Bae, J. H. Yu, and T. K. Oh. 1998b. Cloning of the thermostable phytase gene (phy) from *Bacillus* sp. DSI I and its overexpression in *Escherichia coli*. FEMS Microbiology Letter 162 : 185-191.
- Kirkpinar, F. and H. Basmacioglu. 2006. Effects of pelleting temperature of phytase supplemented broiler feed on tibia mineralization, calcium and phosphorus content of serum and performance. Czech Journal of Animal Science 51 (2): 78-84.
- Konietzny, U. and R. Greiner. 2004. Bacterial Phytase : Potential application, *in Vivo* function and regulation of Its Synthesis. Brazilian Journal of Microbiology 35 : 11-18.
- Kumar, S., R. Nussinov. 2001. How do thermophilic proteins deal with heat ?. A review. Cell. Mol. Live Scie. 58, 1216-1233.
- Laboure, A. M., J. Gagnon, and A. M. Lescure. 1993. Purification and characterization of a phytase (*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase) accumulated in maize (*Zeamays*) seedlings during germination. Biochemistry Journal 295: 413-419.
- Lambrechts, C., H. Boze, G. Moulin, and P. Galzy. 1992. Utilization of phytate by some yeast. Biotechnology Letter 14: 61-66.

- Lan, G.Q., Y. W. Ho, and N. Abdullah. 2002. *Mitsuokella jalaludinii* sp. nov., from the rumens of cattle in Malaysia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 713–718.
- Lay, B. W. 1994. Analisis mikroba dilaboratorium. Raja Grafindo Persada, Jakarta.
- Lehninger, A. L. 1988. Dasar- dasar biokimia. Penerbit Erlangga, Jakarta.
- Lehninger, A. L. 1995. Dasar- dasar biokimia. Penerbit Erlangga, Jakarta.
- Lei, X. G and J. M. Poreess. 2003. Phytase enzymology, applications, and biotechnology. *Biotechnology Letters* 25: 1787–1794.
- Martin, J. A., R. A. Murphy, and R. F. F. Power. 2005. Purification and physico-chemical characterisation of genetically modified phytase expressed in *Aspergillus awamori*. *Bioresource Technology* 97.
- Mikio, S. 1992. Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (natto)N-77. *Enzyme Microbiology and Technology* 56(8):1266-1269.
- Nayini, N. R. and A. M. Markakis. 1984. The phytase of yeast. *Food Science and Technology* 17: 126-132.
- Pallauf, J. and G. Rimbach. 1996. Nutritional significance of phytic acid and phytase. *Archives Animal Nutrition* 50: 301-319.
- Pandey, A., G. Szakacs, C. R. Soccol, J. A. Rodriguez-Leon, and V. T. Soccol,. 2001. *Bioresource Technol.* 77: 203–214.
- Pasamontes, L., M. Haiker, M. Wyss, M. Tessier, and A. P. G. M. van Loon. 1997. Gene cloning, purification and characterization of a heat stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 1696–1700.
- Pelczer, M. J. Jr. dan E. C. S. Chan. 1989. Dasar-dasar mikrobiologi. Terjemahan R. S Hadioetomo T. Tjirosomono. UI Press, Jakarta.
- Powar, V. K. and V. Jagannathan. 1982. Purification and properties of fite-specific phosphatase from *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 151: 1102-1108.
- Reddy, N. R., M. D. Pierson, S. K. Sathe, and D. K. Salunkhe. 1989. *Fitates in cereals and legumes*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- Sasramiharja, L. 1998. Panduan pratikum mikrobiologi terapan. Pusat Antar Universitas. Bioteknologi ITB-Bandung.
- Scott, J. J. 1991. Alkaline phytase activity in inonic detergent extracts of legume seeds. *Plant Physiology* 95 : 1298-1301.
- Selle, P. H., V. Ravindra., R. A. Cadwell, and W. L. Bryden. 2000. Phytate and Phytase: Consequences for protein utilisation. *Nutrition Reviews* : 255-278.

- Selle P. H, Ravindran V. 2006. Microbial phytase in poultry nutrition. *Animal Feed Science and Technology* [http://www. doi:10.1016/j.anifeedsci .com](http://www.doi:10.1016/j.anifeedsci.com) diakses pada tanggal 10 Desember 2008. 14.00 WIB.
- Sequeilha, L., C. Lambrechts, H. Boze, G. Moulin, and P. Galzy. 1992. Purification and properties of the phytase from *Schwanniomyces castelii*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 74: 7-11.
- Shah, V. and L. J. Parekh. 1990. Phytase from *Klebsiella* sp. No. PG-2: Purification and Properties. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* 27: 98-102.
- Shieh, T. R., R. J. Wodzinski, and J. H. Ware. 1969. Regulation of the formation of acid phosphatase by inorganic phosphate in *Aspergillus ficuum*. *Journal of Bacteriology*. 100: 1161-1165.
- Shieh, T. R. and J. H. Ware. 1968. Survey of microorganisms for the production of extracellular phytase. *Applied Microbiology* 16: 1348-1351.
- Shimizu, M. 1992. Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 56: 1266-1269.
- Shimizu, M. 1993. Purification and characterization of phytase and acid phosphatase by *Aspergillus oryzae* K1. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 57: 1364-1365
- Simons, P.C., H.A.J. Versteegh, A. W. Jongbloed, P. A. Kemme, P. Slump, K. D Bos, M. G. E. Wolters, R. F. Beudeker, and G. J. Verschoor. 1990. Improvement of P availability by microbial phytase in broilers and pigs. *British Journal of Nutrition* 64: 525-540.
- Singh, M. and A. D. Krikorian. 1982. Inhibition of trypsin activity *in vivo* by phytate. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 30 : 799-805.
- Steel, R. G. D. dan J. H. Torrie. 1991. Prinsip dan prosedur statistik suatu pendekatan biometrik Ed 2 Cet. 2 Alihbahasa Bambang Sumatri. PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Suhartono, M. P. 1989. Enzim dan bioteknologi. PAU Bioteknologi IPB, Bogor.
- Sutardi, M. and K. A. Buckle. 1988. Characteristics of soybean phytase. *Journal of food biochemistry*. 10: 197-216.
- Tambe, S. M., G. S. Kaklij, S. M. Kelkar, And L. J Parekh. 1994. Two distinct molecular forms of phytase from *Klebsiella aerogenes*: evidence of unusually small active enzyme peptide. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 77: 23-27.
- Ullah , A. H. J. and D. M. Gibson. 1987. Extracellular phytase ( E.C. 3.1. 3.8 0 from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135 : Purification and characteristization. *Preparative Biochemistry* 17: 83-91.

- Ullah, A. H. J. 1988. *Aspergillus ficuum* phytase – partial primary structure, substrate selectivity, and kinetic characterization. *Preparative Biochemistry* 18: 459–471.
- Van der Klis, J.D., H.A.J. Versteegh, and P.C.M. Simons. 1996. Natuphos in laying hen nutrition. Pages 71-82in: BASF Technical Symposium Phosphorus and Calcium Management in layers, Atlanta, GA, January, 23, 1996.
- Volk, W. A. and M. F. Wheeler. 1993. *Mikrobiologi dasar* Ed 5 Cet. 2 Alih bahasa Markam. PT. Gelora Aksara Pratama, Jakarta.
- Wang, D. I. C. P. Demain, A. E. Dunhill, Humplay, and M. D. Lilly. 1979. *Fermentation and enzyme technology*. Jhon Willey and Sons. Inc. New York.
- Xiao-Ling, Z., W. Shen, J. Zhuge, and W. Zheng-Xiang. 2006. Biochemical properties of a thermostable phytase from *Neurospora crassa*. *Federation of European Microbiological Societies and Microbiological Letter* 258: 61–66.
- Yamada, K., Y. Minoda and Y. Yamamoto. 1968. Phytase from *Aspergillus terrus*. Production, purification and some general properties of the enzyme. *Agricultural. Biological Chemistry* 32: 1275-1282.
- Yang, W. J., Y. Matsuda, S. Sano, H. Masutani, And Nakagawa. 1991a. Purification and characterization of phytase from rat intestinal mucosa. *Biochimistry and Biophysics Acta* 1075: 75-82
- Yanke, L.J., H. D. Bae, L. B. Selinger, and K.-J. Cheng. 1998. Phytase activity of anaerobic ruminal bacteria. *Microbiology* **144**: 1565–1573.
- Yoon, S. J., Y. J. Choi, H. K. Min, K. K. Cho, J. W. Kim, S. C. Lee, and Y. H. Jung. 1996. Isolation and identification of phytase-producing bacterium, *Enterobacter* sp. 4, and enzymatic properties of phytase enzyme. *Enzyme Microbiology and Technology* 18: 449-454.