

## Seleksi dan Optimasi Karakter Fisik Bakteri Penghasil Fitase yang Diisolasi dari Sumber Air Panas di Guci, Tegal

C. S. Purwati<sup>1</sup>, Sajidan<sup>2</sup>, A. Ratriyanto<sup>3</sup> dan A. M. P. Nuhriawangsa<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Veteran Bangun Nusantara, Sukoharjo.

<sup>2</sup>Program Studi Pendidikan Biologi, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

<sup>3</sup>Program Studi Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

Jl. Ir. Sutami 36 A Ketigan Surakarta

E-mail: adimagna67@yahoo.co.id

### ABSTRAK

Penelitian bertujuan untuk mengisolasi, menyeleksi dan mengkarakterisasi secara fisik bakteri penghasil fitase dari sumber air panas di Guci, Tegal. Isolasi dan pengkayaan bakteri menggunakan media Lurya Betani dengan substrat asam fitat sebesar 2%. Ekstraksi secara ekstraseluler sehingga diperoleh ekstrak fitase kasar dan optimasi dengan melihat aktivitas relatif dengan melihat selisih produk yang dihasilkan. Bakteri penghasil fitase dapat diisolasi dari sumber air panas dari Guci, Tegal dengan aktivitas relatif tertinggi pada koloni AG2 dan AG2-1. Aktivitas relatif tertinggi pada temperatur 55°C, pH 6, waktu inkubasi 90 menit, konsentrasi substrat 3% dan kofaktor logam Ca<sup>2+</sup> dengan konsentrasi 10<sup>-4</sup>M. Bakteri penghasil fitase dapat diisolasi dari sumber air panas Guci, Tegal dan mempunyai karakter fisik tertentu.

Kata kunci: Bakteri, fitase, air panas, aktivitas relatif, karakter fisik

### *Selection and Optimization of Physical Characters Phytase Producing-Bacteria Isolated from Hot Springs in the Guci, Tegal*

#### ABSTRACT

*The aimed of this study to isolate, select and characterize physically phytase-producing bacteria from hot springs in the Guci, Tegal. Isolation and enrichment of bacteria using Lurya Betani media with 2% of phytic acid substrate. Extraction of extracellular phytase thus obtained extract coarse and optimization by looking at the relative activity at the difference in the resulting product. Phytase-producing bacteria can be isolated from the hot springs of the Guci, Tegal with the highest relative activity in AG2 and AG2-1 colonies. The highest relative activity at a temperature of 55°C, pH 6, the incubation time of 90 minutes, the substrate concentration of 3% and a metal cofactor Ca<sup>2+</sup> at a concentration of 10<sup>-4</sup>M. Phytase-producing bacteria can be isolated from a hot spring in Guci, Tegal and have certain physical characteristics.*

*Keywords: Bacteria, hot spring, physical characteristics, phytase, relative activity*

### PENDAHULUAN

Hidrolisis asam fitat menjadi mioinositol dalam intestinum ayam broiler dipengaruhi oleh kandungan mineral P dan fitase (Zeller *et al.*, 2015). Menurut Mittal *et al.* (2011) fitase juga ditambahkan pada pakan unggas selain ayam broiler sehingga dihasilkan derivat mio-inositol, fosfat

organik dan elemen lainnya yang terikat pada asam fitat tersebut. Hal tersebut dapat menguntungkan kinerja hewan, kesehatan, kualitas daging dan kualitas telur unggas (Coewison *et al.*, 2011).

Pada proses pembuatan pellet pakan unggas bahan pakan dipanaskan menggunakan suhu eksternal 60-90°C dan pada kondisi tersebut dapat memengaruhi

aktivitas dari beberapa enzim yang dicampurkan dalam pakan tersebut (Spring *et al.*, 1996). Mikroorganisme termofilik penting karena dapat menghasilkan produksi enzim yang stabil terhadap panas, sehingga dapat digunakan pada produk komersial tertentu (Mehta *et al.*, 2016). Fitase yang digunakan pada proses pembuatan pakan harus stabil pada kondisi panas, karena tingginya temperatur pada saat pembuatan pakan (Kanpiengjai, 2013).

Beberapa bakteri penghasil fitase sudah dapat diisolasi dan dikarakterisasi dari daerah di Indonesia. Strain bakteri *Eschericia coli*, *Bacillus subtilis* dan *Klebsiella pneumoniae* sudah dapat diisolasi dan diaplikasikan pada ayam broiler (Sajidan *et al.*, 2004). Bakteri penghasil fitase berkode AP-17 dari Kawah Ijen Banyuwang dapat diisolasi dan diduga merupakan kelompok *Bacillus* (Kusumadjaja *et al.*, 2009). Hasil isolasi dari sumber abu vulkanik Merapi dihasilkan bakteri penghasil fitase *Bacillus cereus*, *Bacillus aryabhatai* dan *Bacillus cereus* dengan karakter tertentu (Wulandari *et al.*, 2011).

Penelitian bertujuan untuk mengisolasi, menyeleksi dan mengkarakterisasi secara fisik bakteri penghasil fitase dari sumber air panas di Guci, Tegal, sehingga diharapkan dapat dihasilkan enzim termostabil yang dapat diaplikasikan untuk campuran pakan ternak komersial.

## MATERI DAN METODE

Materi yang digunakan adalah sumber air panas Guci, media LB cair (per liter aquabides mengandung tripton 10 g, ekstrak yeast 5 g dan NaCl 10 g), LB padat (LB cair ditambah 15 g agar/liter), Na-fitat, Na-asetat, kofaktor ion  $Ca^{2+}$ , *ammonium molibdate*, *ammonium metavanadate* dan aquades.

Isolat bakteri diperoleh dengan cara melarutkan 1ml air panas Guci dan air pada 1,5 ml NaCl fisiologis dan ditanam pada media LB padat selama 18 jam pada suhu 37°C. Seleksi dilaksanakan untuk

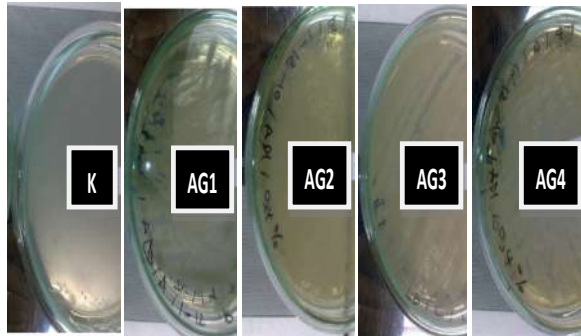
memperoleh isolat dengan aktivitas relatif tertinggi. Aktivitas relatif dihitung dengan melihat absorbansi terkoreksi sampel x 100%. Absorbansi terkoreksi adalah absorbansi sampel dikurangi kontrol dibagi absorbansi sampel tertinggi dikurangi kontrol (Sajidan, 2002).

Kultur cair hasil inkubasi isolat dengan aktivitas relatif tertinggi disentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 5 menit dan supernatan diambil sebagai sumber ekstrak kasar fitase. Ekstrak enzim kasar dioptimasi untuk mengetahui karakter fisik yang meliputi temperatur, pH, waktu inkubasi, konsentrasi substrat dan kofaktor logam. Aktivitas ekstrak kasar fitase diuji dengan 50 µl enzim, 150 µl susbtrat (0,4 % Na-fitat dalam 100 mM Na-asetat) diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan larutan STOP sebanyak 400 µl. (Larutan A: 2,352 g ammonium molibdat dalam 100 ml aquades ditambah 2 ml asam salpeter ( $HNO_3$ ). Larutan B: 10 g ammonium metavanadat dalam 100 ml aquades ditambah 1 ml 25%  $NH_4OH$ . Larutan STOP memcampur larutan A, larutan B, asam salpeter dan aquades dengan perbandingan = 1,5:1,5:1:2).Warna kuning dari fosfomolibdat diukur dengan spektrofotometer pada  $\lambda$  415 nm (Sajidan, 2002).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

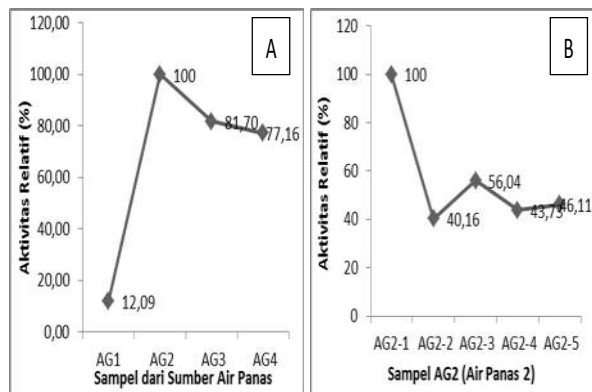
Hasil isolasi bakteri penghasil fitase berupa koloni yang diambil dari sumber air panas di Guci, Tegal tampak pada Gambar 1 yang menunjukkan bahwa sumber air panas dari air Guci, Tegal mengandung bakteri penghasil fitase. Hal ini sesuai dengan beberapa penelitian yang dapat mengisolasi dari sumber air panas bakteri penghasil fitase. Bakteri penghasil fitase telah diisolasi dari daerah aliran sungai Gendol dan Boyong, Sleman, DIY dan sumber air panas di Gedongsongo, Ungaran, Jawa Tengah (Sajidan *et al.*, 2010). Bakteri *Anoxybacillus* sp. MHW14 telah dapat diisolasi dari sumber air panas di daerah Chiang Mai,

Thailand (Kanpiengjai, 2013). *Bacillus* sp. DM12 dapat diisolasi dari sumber air panas di Dimand, Jiroft, Iran (Parhamfar *et al.*, 2015). *Thermomyces lanuginosus* dapat diisolasi dari sumber air panas di Turki (Berikten dan Kivanc, 2014).



Gambar 1. Koloni bakteri yang diambil dari sumber air panas Guci dalam media LB dengan asam fitat 0,4% (K = kontrol, AG1-4 = koloni bakteri 1 sampai 4)

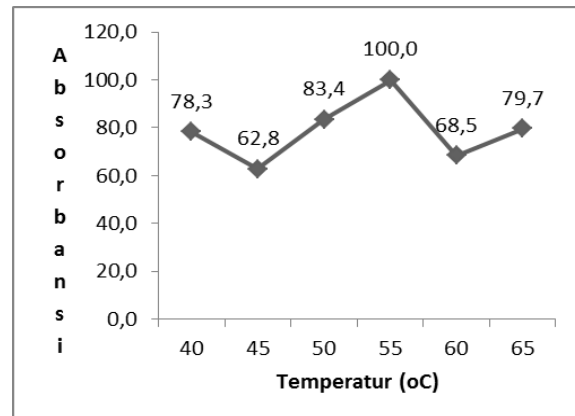
Bakteri penghasil fitase yang telah diisolasi ternyata mempunyai aktivitas dalam menghidrolisis asam fitat dengan dilihat aktifitas relatifnya dan aktivitas tertinggi pada AG2 dan AG2-1 (Gambar 2).



Gambar 2. Seleksi aktivitas relatif bakteri yang diambil dari sumber air panas Guci koloni AG1 sampai 4 (A) dan AG2-1 sampai 5 (B)

Hal ini sesuai dengan penelitian Kusumadjaja *et al.* (2009) bahwa Isolat AP-17 merupakan isolat penghasil fitase dengan aktivitas terbesar. Bakteri *Anoxybacillus* sp. MHW14 dari sumber air panas di daerah Chiang Mai, Thailand mampu memproduksi fitase (Kanpiengjai,

2013). *Bacillus* sp. DM12 dari sumber air panas di Dimand, Jiroft, Iran mempunyai aktivitas dalam menghidrolisis asam fitat (Parhamfar *et al.*, 2015). *Thermomyces lanuginosus* dapat diisolasi dari sumber air panas di Turki dan mempunyai aktivitas fitase (Berikten dan Kivanc, 2014). Bakteri penghasil fitase koloni AG2-1 mempunyai aktifitas tertinggi pada temperatur 55°C (Gambar 3).



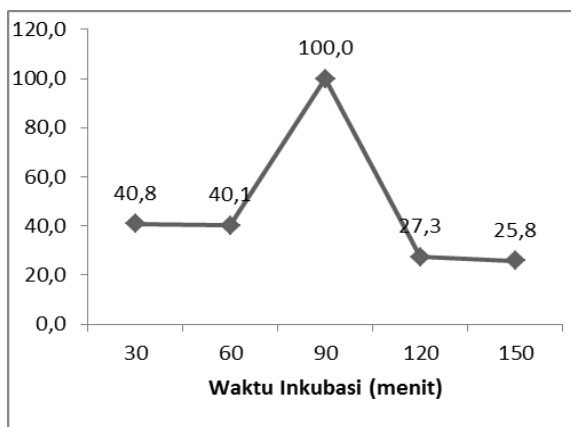
Gambar 3. Optimasi temperatur koloni bakteri AG2-1 (Absorbansi = aktivitas relatif)

Beberapa bakteri yang diambil dari sumber air panas mempunyai temperatur optimum yang berbeda. Bakteri *Anoxybacillus* sp. MHW14 dari sumber air panas di daerah Chiang Mai, Thailand mempunyai aktifitas optimum pada temperatur 45°C (Kanpiengjai, 2013). *Bacillus* sp. DM12 dari sumber air panas di Dimand, Jiroft, Iran mempunyai aktivitas optimum pada temperatur 55°C (Parhamfar *et al.*, 2015). *Thermomyces lanuginosus* dapat dari sumber air panas di Turki mempunyai aktivitas optimum pada temperatur 55°C (Berikten dan Kivanc, 2014). Bakteri AG2-1 mempunyai aktifitas relatif tertinggi pada pH 6 (Gambar 4).

Beberapa penelitian pada koloni bakteri penghasil fitase dari sumber air panas mempunyai pH optimum yang berbeda. Bakteri *Anoxybacillus* sp. MHW14 dari daerah Chiang Mai, Thailand mempunyai aktifitas optimum pada pH 7 (Kanpiengjai, 2013). *Bacillus* sp. DM12 dari Dimand, Jiroft, Iran mempunyai aktivitas optimum

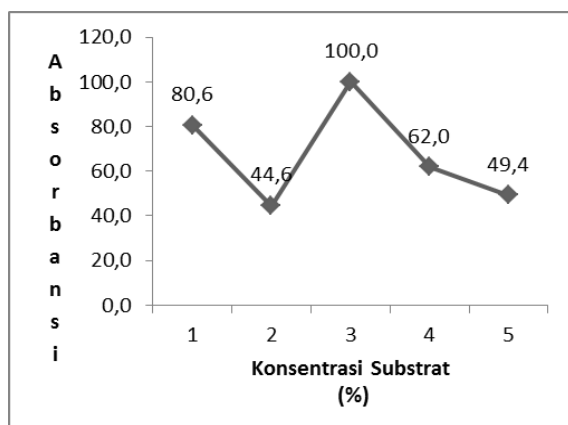
pada pH 4,5 (Parhamfar *et al.*, 2015). *Thermomyces lanuginosus* dapat dari Turki mempunyai aktivitas optimum pada pH 7,5 (Berikten dan Kivanc, 2014).

Bakteri AG2-1 mempunyai aktifitas relatif tertinggi pada waktu inkubasi 90 menit (Gambar 5). Beberapa penelitian pada koloni bakteri penghasil fitase dari sumber air panas mempunyai waktu inkubasi optimum yang berbeda. Bakteri *Anoxybacillus* sp. MHW14 dari daerah Chiang Mai, Thailand mempunyai aktifitas optimum pada waktu inkubasi 30 menit (Kanpiengjai, 2013). *Bacillus* sp. DM12 dari Dimand, Jiroft, Iran mempunyai aktivitas optimum pada waktu inkubasi 30 menit (Parhamfar *et al.*, 2015).



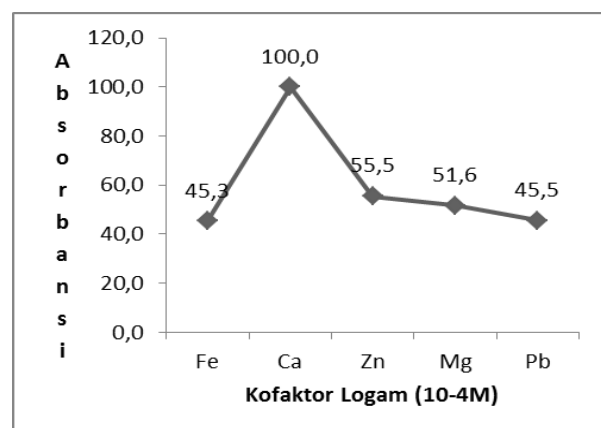
Gambar 5. Optimasi waktu inkubasi koloni bakteri AG2-1 (Absorbansi = aktivitas relatif)

Bakteri AG2-1 mempunyai aktifitas relatif tertinggi pada konsentrasi substrat 3% (Gambar 6).



Gambar 6. Optimasi konsentrasi substrat koloni bakteri AG2-1 (Absorbansi = aktivitas relatif)

Beberapa penelitian pada koloni bakteri penghasil fitase dari sumber air panas mempunyai konsentrasi substrat optimum yang berbeda. Bakteri *Anoxybacillus* sp. MHW14 dari daerah Chiang Mai, Thailand mempunyai aktifitas optimum pada konsentrasi substrat 10,35% bekatul padi (Kanpiengjai, 2013). *Bacillus* sp. DM12 dari Dimand, Jiroft, Iran mempunyai aktivitas optimum pada konsentrasi substrat 0,177 mM Na-fitat (Parhamfar *et al.*, 2015). Bakteri AG2-1 mempunyai aktifitas relatif tertinggi pada kofaktor logam  $Ca^{2+}$  (Gambar 7).



Gambar 7. Optimasi kofaktor logam koloni bakteri AG2-1 (Absorbansi = aktivitas relatif)

Beberapa penelitian pada koloni bakteri penghasil fitase dari sumber air panas mempunyai kofaktor logam yang berbeda. *Bacillus* sp. DM12 dari Dimand, Jiroft, Iran mempunyai aktivitas optimum pada kofaktor logam  $Ca^{2+}/CaCl_2$  (Parhamfar *et al.*, 2015). *Thermomyces lanuginosus* dapat dari Turki mempunyai aktivitas optimum pada kofaktor logam  $Zn^{2+}/ZnSO_4$  (Berikten dan Kivanc, 2014).

## DAFTAR PUSTAKA

- Berikten, D. and M. Kivanc. 2014. Optimization of solid-state fermentation for phytase production by *Thermomyces lanuginosus* using response surface methodology. *Journal Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 44(8): 834-848.

- Cowieson, A. J., P. Wilcock and M. R. Bedford. 2011. Super-dosing effects of phytase in poultry and other monogastrics. *World's Poultry Science Journal*. 67(2011): 225-235.
- Kanpiengjai, A., K. Unban, R. Prathanaphon and C. Khanongnuch. 2013. Optimal medium and conditions for phytase production by thermophilic bacterium, *Anoxybacillus* sp. MHW14. *Food and Applied Bioscience Journal*. 1(3): 172-189.
- Kusumadjaja, A. P., T. Budiati, N. N. T. Puspaningsih dan Sajidan. 2009. Screening Mikroorganisme Termofilik Penghasil Enzim Fitase yang Tumbuh di Kawah Ijen Banyuwangi. *Indonesian Journal of Chemistry*. 9(3):500-504.
- Mehta, R., P. Singhal, H. Singh, D. Damle and A. K. Sharma. 2016. Insight into thermophiles and their wide-spectrum applications. *Biotechnology*. 6:81(1-9).
- Mittal, A., G. Singh, V. Goyal, A. Yadav, K. R. Aneja, S. K. Gautam, N. K. Aggarwal. 2011. Isolation and biochemical characterization of acido-thermophilic extracellular phytase producing bacterial strain for potential application in poultry feed. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 4(4):273-282.
- Sajidan. 2002. Molekulare Charakterisierung einer Phytase (Myo-inositol Hexakifosfate Hydrolase) und von Fosfatasen aus Bakteriesolaten Indonesischer Reisfelder (*Klebsiella pneumoniae*). *Dissertation*. Institut fuer Biologie. Humboldt Universitat zu Berlin. Deutschland (Germany).
- Sajidan, A. M. P. Nuhriawangsa, A. Ratriyanto and R. Greiner. 2010. Isolation and Characterization of Phytase-Producing Bacteria from Extreme Regions in Indonesia. *Laporan Hibah Kolaborasi Internasional*. FKIP, UNS, Surakarta.
- Spring, P., K. E. Newman, C. Wenk, R. Messikommer, and M. V. Vranjes. 1996. Effect of pelleting temperature on the activity of different enzymes. *Poultry Science*. 75:357-361
- Wulandari, R., Sajidan dan Suranto. 2011. Analisis Gen 16s rRNA pada Bakteri Penghasil Enzim Fitase. *Naskah Publikasi Thesis*. Program Studi Magister Biosains, Program Pasca Sarjana, Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Zahoor, S., H. M. Javed and M. E. Babar. 2016. Characterization of a novel hydrolytic enzyme producing Thermophilic bacterium isolated from the hot spring of Azad Kashmir-Pakistan. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 59(2016):1-13.
- Zeller, E., M. Schollenberger, M. Witzig, Y. Shastak, I. Kuhn, L. E. Hoelzle and M. Rodehutschord. 2015. Interactions between supplemented mineral phosphorus and phytase on phytate hydrolysis and inositol phosphates in the small intestine of broilers. *Poultry Science*. 94:1018-1029.