

ISOLASI, PEMURNIAN DAN KARAKTERISASI FITASE *BACILLUS SUBTILIS* DARI HOLIWOOD GRESIK

(Isolation, Purification and Characterization of *Bacillus subtilis* Phytase from Holiwood Gresik)

Leny Yuanita, Aline Puspita, Suzana Surodjo, Sri Hidayati, Farid Al Amin, dan Arif Budiman
Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Surabaya

ABSTRACT

The aim of the research were isolation, purification and characterization of *Bacillus subtilis* phytase from Holiwood Gresik. The research was done in two stages; the first include enzyme isolation, precipitation with ammonium sulphate, dialysis, gel filtration chromatography, SDS-PAGE analysis, while second determining optimum pH, optimum temperature, the effect of pH and temperature to enzyme stability, the values of K_M and V_{max} *Bacillus subtilis* phytase from Holiwood Gresik. The first stage research design were One Shot Case Study and Post Test Only Control Group Design, while the second stage were Post Test Only Control Group Design and Factorial Design. The data being analyzed by one-way and two-way Anova. The results of research showed that *Bacillus subtilis* phytase has the molecular mass of 36.5 kDa, optimum pH at 6.5–7.0, optimum temperature at 41°C and it was found to be stable for 30 minute incubation at pH 7 or 30°C with 2% or 3% lost of its activity respectively. K_M value was 0.62 mM and V_{Max} 0.393 $\mu\text{mol/ml/minute}$.

Key words: phytase, purification, characterization, *Bacillus subtilis*, Holiwood Gresik

PENGANTAR

Sekitar 60–90% mineral fosfor tanaman terdapat sebagai asam fitat atau garamnya yang mempunyai kemampuan mengikat protein, pati, maupun berbagai mineral. Pada kondisi pH fisiologis, asam fitat terutama berikatan dengan kation mono atau divalen membentuk kompleks sehingga memengaruhi bioavailabilitasnya. Enzim fitase endogen dalam tanaman mempunyai aktivitas rendah, sehingga kandungan fitat yang tinggi akan menurunkan ketersediaan zat gizi bahan.

Berbagai cara telah dilakukan untuk mendegradasi fitat yaitu prosesing, pengaturan pH medium, hingga pembuatan tanaman transgenik. Menurut Hurrell (2002) melalui teknik enzimatik sangat mungkin terjadi degradasi sempurna terhadap fitat serealialia maupun kacang-kacangan; sedangkan Haros *et al.* (2001) mengemukakan bahwa keuntungan penggunaan enzim fitase adalah meningkatkan nutrisi melalui penurunan kandungan fitat dan mampu meningkatkan aktivitas α -amilase endogen. Fitase (mio-inositol heksakisfosfat fosfohidrolase) merupakan fosfomonoesterase menghidrolisis asam fitat menjadi ortofosfat anorganik dan mio-inositol pentakis-, tetrakis-, tris-, bis-, dan monofosfat (Greiner dan Konietzny, 2006)

Fitase dapat diperoleh dari tanaman, mikroorganisme maupun beberapa jaringan hewan tertentu. Fitase mikroorganisme memiliki potensi yang sangat baik

untuk dikembangkan mengingat karakternya yang sangat menguntungkan untuk dunia industri. Fitase mikroorganisme memiliki keunggulan, antara lain potensi produksi yang tidak terbatas, relatif mudah dan murah serta dapat dikendalikan. Mikroorganisme yang diperoleh dari tanah defisiensi fosfat atau dalam keadaan tidak tersedia (misalkan tanah berkapur) akan mempunyai potensi tinggi penghasil fitase. Telah diisolasi bakteri penghasil fitase mesofil (yang mempunyai aktivitas tertinggi) dari tanah di sisi barat gunung kapur Holiwood Gresik, Jawa Timur. Bakteri tersebut gram positif dan berdasarkan uji fisiologi, biokimiawi, dan analisis gen 16s-RNA disimpulkan spesiesnya adalah *Bacillus subtilis* (Yuanita dkk., 2007), selanjutnya disebut *B. subtilis* HG, singkatan dari *Bacillus subtilis* Holiwood Gresik. Fitase *Bacillus sp.* merupakan enzim ekstraseluler sehingga isolasi dilakukan dengan cara memisahkan sel secara sentrifugasi dan pemurnian melalui pengendapan pada suhu dingin dengan garam amonium konsentrasi tinggi atau pelarut organik (Deutcher, 1990). Pemurnian lanjut melalui dialisis dan filtrasi gel, sedangkan untuk mengetahui kemurnian enzim dilakukan analisis SDS PAGE (*sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis*).

Setiap enzim mempunyai pH dan suhu optimum spesifik untuk aktivitas dan degradasinya, stabilitas pH dan stabilitas termal, serta nilai konstanta Michaelis-Menten (K_M) dan kecepatan reaksi maksimum (V_{maks}). Oleh karena itu, isolasi dan karakterisasi fitase sangat dibutuhkan untuk

menentukan karakter spesifiknya sehingga fitase dapat dimanfaatkan secara optimal pada kondisi yang dibutuhkan pada penerapan penggunaannya.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan pada propagasi bakteri: isolat *Bacillus subtilis* HG, yeast, trypton, NaCl, dan bacto agar; media *screening*: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 , FeSO_4 , CaCl_2 , MnSO_4 , glukosa, dan natrium fitat; uji aktivitas fitase: amonium heptamolibdat, amonium fero sulfat, H_2SO_4 10 M, TCA 5%, bufer sitrat 0,1M, Tris-HCl 0,1 M, dan larutan standar KH_2PO_4 ; uji kadar protein: reagen Biuret dan standar *bovine serum albumin* (BSA). Alat yang digunakan adalah: spektrofotometer UV-vis, sentrifuse, otoklaf, *shaker incubator*, *water bath*, mikropipet, membran dialisis, seperangkat alat kromatografi filtrasi gel dan SDS-PAGE.

Cara Kerja

Penelitian terdiri atas 2 tahap. Tahap I: Isolasi dan pemurnian fitase melalui pengendapan dengan amonium sulfat, dialisis, kromatografi filtrasi gel dan analisis dengan SDS PAGE. Tahap II: karakterisasi fitase meliputi pH dan suhu optimum, stabilitas pH dan termal, K_M dan V_{maks} . Rancangan penelitian Tahap I: *One Shot Case Study* dan *Post Test Only Control Group Design*, tahap II adalah *Post Test Only Control Group Design* dan *Factorial Design*.

Isolasi dan Pemurnian Fitase *B. subtilis* HG

Tahap propagasi dan pertumbuhan dalam media *screening* melalui inkubasi dengan dishaker pada kecepatan 175 rpm, suhu 37° C, selama 20 jam (waktu inkubasi optimum sesuai kurva pertumbuhan *B. subtilis* HG). Suspensi disentrifugasi pada 4000 rpm, suhu 4° C, selama 30 menit. Terhadap supernatan atau ekstrak kasar fitase, diuji aktivitas enzim dan kadar protein. Ekstrak kasar fitase yang diperoleh dari hasil isolasi diendapkan dengan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ konsentrasi kejenuhan 0–20%, 20–40%, 40–60% dan 60–80%, suhu 4° C. Didiamkan semalam, sentrifugasi pada 4.000 rpm pada suhu 4° C selama 30 menit. Endapan dilarutkan dengan buffer Tris-HCl 0,1 M pH 7, diuji aktivitas enzim dan kadar protein.

Proses dialisis dilakukan melalui membran dialisis 12.000–14.000 Dalton dalam bufer Tris-HCl 0,1 M pH 7, suhu 4° C dengan pengaduk magnetik. Sisa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ diuji dengan BaCl_2 1%. Setelah tidak terbentuk endapan putih BaSO_4 , dilakukan uji kadar protein dan aktivitas fraksi enzim hasil dialisis. Pemurnian lanjut terhadap hasil

dialisis melalui kolom kromatografi filtrasi gel Sephadex G-100 berukuran 1 cm × 60 cm, eluen buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,0. Elusi dilakukan dengan laju alir 0,1 ml/menit. Tiap fraksi yang diperoleh ditampung dan dilakukan uji aktivitas fitase.

Kadar protein ditentukan dengan metode Biuret pada λ 520 nm dengan standar BSA. Aktivitas enzim diuji melalui prosedur berikut. Ke dalam 425 μl natrium fitat dan 150 μl 1 mM CaCl_2 , ditambahkan 425 μl larutan enzim dan inkubasi 15 menit pada 37° C. Kemudian ditambahkan 750 μl TCA 5%, inkubasi 15 menit dan sentrifuse 4000 rpm selama 5 menit pada 4° C. Terhadap supernatan diuji dengan reagen amonium heptamolibdat-fero sulfat, absorbansi dibaca pada λ 690 nm (Affrifah *et al.*, 2005; Boyce *et al.*, 2004). Aktivitas enzim dinyatakan dalam unit/ml, merupakan $\mu\text{mol PO}_4^{3-}$ yang dilepas per menit per mililiter enzim.

Enzim hasil proses pemurnian dianalisis dengan SDS-PAGE tipe vertikal. Sistem gel diskontinyu terdiri atas *stacking* gel dan *separating* gel, sedangkan *marker* protein (protein petanda) menggunakan *High Molecular Weight Protein*. Elektroforesis dilakukan pada 20 mA dan 150 V. Berdasarkan kurva standar protein petanda antara mobilitas relatif (Rf) vs Mr protein petanda, maka dapat ditentukan Mr protein enzim.

Karakterisasi Fitase *B. subtilis* HG

Penentuan pH dan suhu optimum

Fraksi enzim fitase dengan aktivitas tertinggi ditentukan pH dan suhu optimumnya. Kondisi optimum ditentukan berdasarkan aktivitas maksimum yang dicapai. Penentuan pH optimum dilakukan pada variasi pH 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; dan 8 dengan suhu inkubasi 37° C, sedangkan penentuan suhu optimum dilakukan pada 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 49, dan 53° C dengan inkubasi pH 7 (Greiner *et al.*, 2001; Widowati dkk., 2001).

Pengaruh pH dan Suhu terhadap Stabilitas Fitase

Penentuan pengaruh pH terhadap stabilitas enzim dilakukan melalui penentuan aktivitas fitase pada pH 4, 7, dan 10 dengan waktu inkubasi yang berbeda, yaitu tanpa inkubasi, 30, 60, dan 90 menit; sedangkan pada pengaruh suhu dilakukan melalui penentuan aktivitas fitase pada suhu 30, 40, dan 50° C dengan waktu inkubasi yang berbeda yaitu tanpa inkubasi, 30, 60, dan 90 menit (Beydemir *et al.*, 2003; Richana dkk., 2008; Wang *et al.*, 2004).

Penentuan K_M dan V_{maks}

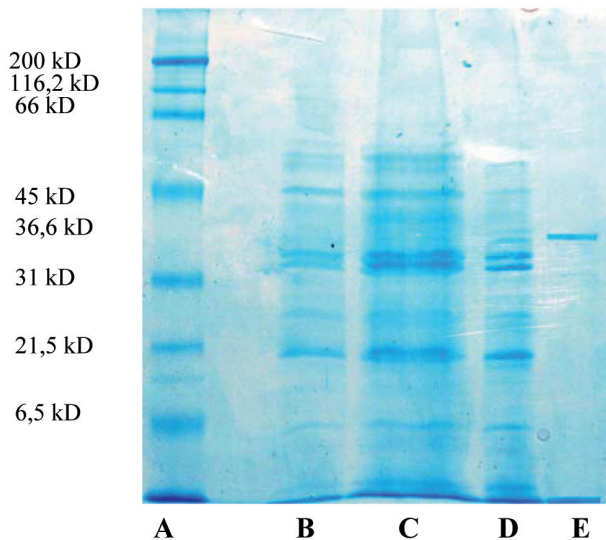
Penentuan aktivitas enzim fitase pada beberapa konsentrasi substrat dilakukan pada kondisi optimum, yaitu suhu 41° C dan pH 7,0. Variasi konsentrasi substrat yang

digunakan adalah 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 3,5; dan 4,0 mM (Richana dkk., 2008; Widowati dkk., 2001). Berdasarkan variasi konsentrasi substrat ditentukan nilai K_M dan V_{maks} fitase.

HASIL

Isolasi dan Pemurnian Fitase *B. subtilis* HG

Pemurnian terhadap ekstrak kasar enzim fitase hasil isolasi dilakukan melalui pengendapan dengan $(NH_4)_2SO_4$, dialisis dan filtrasi gel. Hasil uji aktivitas enzim fitase dan



Gambar 1. Tingkat kemurnian enzim fitase isolat *Bacillus subtilis* HG pada SDS-PAGE dengan tahap (B) ekstrak kasar, (C) pengendapan $(NH_4)_2SO_4$ 80%, (D) dialisis, (E) kromatografi filtrasi gel. (A) merupakan standar protein atau marker.

kadar protein dari isolasi dan pemurnian hingga tahap pengendapan dengan $(NH_4)_2SO_4$ terdapat pada Tabel 1. Hasil uji tersebut menunjukkan bahwa aktivitas dan kadar protein tertinggi terdapat pada fraksi $(NH_4)_2SO_4$ 60–80%.

Perbandingan kadar protein, aktivitas, dan tingkat kemurnian enzim fitase hasil pemurnian terdapat pada Tabel 2.

Data Tabel 2 menunjukkan bahwa berdasarkan aktivitas spesifik enzim, pemurnian enzim fitase melalui filtrasi gel dengan kolom Sephadex G-100 memberikan tingkat kemurnian 10,5 kali dari ekstrak kasar.

Tingkat kemurnian hasil filtrasi gel juga teramati pada hasil analisis SDS-PAGE, seperti pada Gambar 1. Hasil analisis menunjukkan terdapat satu pita yang tersisa dengan daerah Mr sekitar 36,6 kDa, berarti telah didapatkan protein murni. Terhadap enzim hasil pemurnian dilakukan karakterisasi.

Karakterisasi Fitase *B. subtilis* HG

pH dan Suhu Optimum

Aktivitas fitase *Bacillus subtilis* HG pada variasi pH terdapat pada Tabel 3, sedangkan aktivitas enzim fitase pada berbagai suhu terdapat pada Tabel 4.

Tabel 3 menunjukkan bahwa aktivitas enzim fitase mencapai pH optimum pada pH 7,0, dengan aktivitas 0,283 U/ml. Berdasarkan uji Anova satu arah dan LSD menunjukkan bahwa pH optimum fitase *Bacillus subtilis* HG berkisar pada pH 6,5–7,0.

Tabel 4 menunjukkan bahwa suhu optimum enzim fitase dari *Bacillus subtilis* HG dicapai pada suhu 41° C, dengan aktivitas sebesar 0,301 U/ml.

Tabel 1. Kadar protein dan aktivitas ekstrak kasar enzim fitase *B. subtilis* HG pada fraksi pengendapan dengan amonium sulfat $(NH_4)_2SO_4$

Fraksi $(NH_4)_2SO_4$ (%)	Kadar Protein (mg/ml)	Aktivitas Fitase (U/ml)	Aktivitas Spesifik (U/mg)
0–20	2,979	0,104	0,035
20–40	3,194	0,130	0,041
40–60	3,436	0,143	0,042
60–80	3,694	0,162	0,044

Tabel 2. Kadar protein, aktivitas dan tingkat kemurnian enzim fitase *B. subtilis* HG

Tahapan	Kadar Protein (mg/ml)	Aktivitas Fitase (U/ml)	Aktivitas Spesifik (U/mg)	Kemurnian (kali)
Ekstrak kasar	6,661	0,254	0,038	1,0
Pengendapan $(NH_4)_2SO_4$	3,522	0,163	0,046	1,2
Dialisis	1,109	0,234	0,211	5,5
Kromatografi Filtrasi Gel	0,584	0,235	0,402	10,5

Tabel 3. Aktivitas enzim fitase pada variasi pH

pH	Aktivitas fitase (U/ml)	F, p
4,0	0,142 ^a	F = 120,604 p = 0,000
4,5	0,180 ^b	
5,0	0,205 ^c	
5,5	0,223 ^{di}	
6,0	0,255 ^e	
6,5	0,272 ^{fg}	
7,0	0,283 ^{fg}	
7,5	0,269 ^{fh}	
8,0	0,228 ^{di}	

Keterangan: huruf berbeda pada kolom berbeda menunjukkan perbedaan secara signifikan (p < 0,05)

Tabel 4. Aktivitas enzim fitase pada variasi suhu

Suhu (° C)	Aktivitas fitase (U/ml)	F, p
21	0,183 ^a	F = 222,913 p = 0,000
25	0,200 ^b	
29	0,217 ^{ci}	
33	0,247 ^{dh}	
37	0,281 ^{eg}	
41	0,301 ^f	
45	0,279 ^{eg}	
49	0,241 ^{dh}	
53	0,209 ^{ci}	

Keterangan: huruf berbeda pada kolom berbeda menunjukkan perbedaan secara signifikan (p < 0,05)

Pengaruh pH dan Suhu terhadap Stabilitas Fitase

Hasil uji pengaruh pH dan suhu terhadap stabilitas enzim teramati pada persentase aktivitas fitase variasi pH maupun suhu pada variasi waktu inkubasi, seperti terdapat pada Tabel 5 dan Tabel 6. Aktivitas fitase pada berbagai waktu inkubasi dibandingkan dengan tanpa inkubasi (aktivitas fitase 100%).

Nilai K_M dan V_{Maks}

Tetapan Michaelis-Menten (K_M) dan kecepatan maksimum (V_{Maks}) dapat dihitung dengan tranformasi kebalikan ganda persamaan Michaelis-Menten menjadi persamaan Lineweaver-Burk. Variasi konsentrasi substrat yang digunakan adalah 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 3,5; 4,0 mM. Gambar 2 menunjukkan pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim fitase *B.subtilis* HG.

Gambar 3 menunjukkan hubungan antara (1/[S]) dengan (1/V) dengan persamaan Lineweaver-Burk:

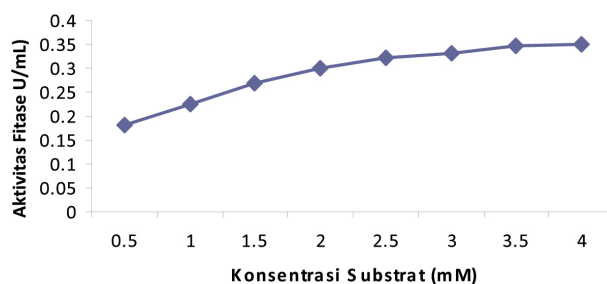
$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{maks}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{maks}}$$

Tabel 5. Persentase aktivitas fitase pada variasi pH dan waktu inkubasi

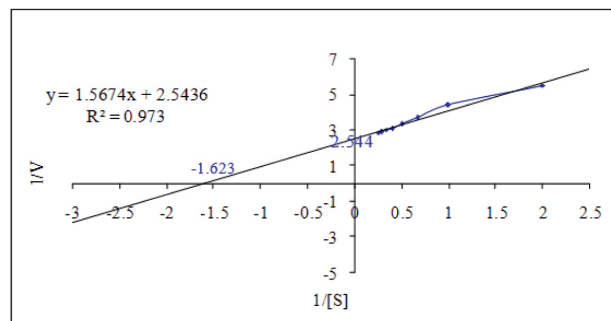
Waktu Inkubasi (menit)	Persentase aktivitas fitase		
	pH 4	pH 7	pH 10
30	92	98	94
60	81	96	86
90	69	95	73

Tabel 6. Persentase aktivitas enzim fitase pada variasi suhu dan waktu inkubasi

Waktu Inkubasi (menit)	Persentase aktivitas fitase		
	30° C	40° C	50° C
30	97	96	90
60	85	92	62
90	72	87	34



Gambar 2. Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas fitase



Gambar 3. Kurva Lineweaver-Burk enzim fitase (1/[S]) vs (1/V)

PEMBAHASAN

Isolasi dan pemurnian fitase *B. subtilis* HG

Media *screening* yang digunakan mengandung substrat natrium fitat sehingga hanya bakteri penghasil fitase yang dapat hidup pada media tersebut. Natrium fitat terhidrolisis oleh fitase menghasilkan fosfat anorganik yang akan dipergunakan oleh bakteri untuk proses metabolismenya.

Suspensi fitase ekstrak kasar disentrifugasi 4000 rpm pada suhu 4° C selama 30 menit. Proses ini bertujuan memisahkan pengotor dari ekstrak kasar enzim sambil mencegah denaturasi dan menjaga kestabilan enzim.

Prinsip pengendapan dengan amonium sulfat adalah *salting out*, amonium sulfat mampu mengikat molekul air yang mengelilingi molekul protein sehingga protein mengendap. Tujuan pengendapan adalah memekatkan enzim dan pemisahan komponen protein berdasarkan sifat ioniknya. Tabel 1 menunjukkan bahwa aktivitas fitase dan kadar protein tertinggi terdapat pada fraksi 60–80%, dibandingkan dengan hasil fraksi yang lain.

Fraksi yang memiliki aktivitas fitase dan kadar protein tertinggi kemudian didialisis menggunakan membran selofan dan buffer Tris-HCl 0,1M pH 7. Tujuan dari proses ini adalah untuk menghilangkan sisa-sisa amonium sulfat yang masih bercampur dengan molekul enzim. Pada dialisis molekul berukuran lebih besar dari diameter pori akan tertahan dalam kantong selofan, sedangkan molekul kecil dan ion dapat melewati pori-pori membran. Dialisis diakhiri setelah 18 jam ketika tidak terbentuk endapan putih BaSO₄ jika buffer dialisis diuji dengan larutan BaCl₂ 1%.

Kromatografi filtrasi gel merupakan teknik pemisahan protein berdasarkan pada ukuran molekul. Matriks filtrasi gel merupakan gel yang berpori yang dikemas dalam kolom. Pori-pori matriks dapat menampung molekul yang berukuran kecil dan memisahkannya dari molekul yang mempunyai massa molekul relatif (Mr) tinggi sehingga teknik ini dapat pula digunakan untuk penentuan Mr protein. Protein yang berukuran besar akan terelusi keluar terlebih dahulu daripada protein yang berukuran lebih kecil. Hasil pemurnian menggunakan kolom Sephadex G-100 menghasilkan beberapa fraksi. Fraksi yang memiliki aktivitas fitase yang tertinggi adalah fraksi ke-7 dengan aktivitas spesifik sebesar 0,402 U/mg. Pemurnian enzim fitase dengan kolom Sephadex G-100 menghasilkan enzim dengan tingkat kemurnian sampai 10,5 kali ekstrak kasar (Tabel 2). Aktivitas spesifik fitase semakin meningkat pada beberapa tahap pemurnian yaitu dari ekstrak kasar hingga kromatografi filtrasi gel. Hal ini disebabkan karena semakin berkurangnya pengotor sehingga tingkat kemurnian enzim fitase semakin meningkat.

Prinsip analisis SDS-PAGE, yaitu pemisahan protein berdasarkan ukuran molekul. Deterjen ionik (SDS) akan bereaksi dengan protein dan membentuk kompleks yang mengandung muatan negatif sehingga pergerakan protein dalam medan listrik hanya didasarkan pada ukuran molekul. Protein yang berukuran kecil akan bergerak lebih cepat dibandingkan dengan protein berukuran besar. Mr protein dapat diukur dengan menggunakan protein standar yang

telah diketahui Mr nya dengan cara membandingkan nilai mobilitas relatif (R_f).

Berdasarkan hasil SDS-PAGE, pada sumur B merupakan enzim fitase yang diisolasi dari supernatan, terlihat masih banyak terdapat pita-pita protein baik protein yang merupakan enzim fitase maupun pengotor. Hal ini terindikasi dengan masih rendahnya aktivitas fitase. Sumur C dan D merupakan hasil pengendapan dengan amonium sulfat 80% dan dialisis, yang bertujuan memisahkan enzim dari senyawa-senyawa yang tidak dikehendaki. Hasil pemurnian dengan kolom Sephadex G-100 pada fraksi ke-7 menunjukkan hasil satu pita tunggal dengan Mr sekitar 36,6 kDa. Hal ini berarti bahwa telah dihasilkan protein murni dengan aktivitas fitase sebesar 0,235 U/ml yang ditunjukkan dengan adanya pita tunggal pada elektroforegram SDS-PAGE. Pita tersebut diperkirakan enzim fitase isolat *B. subtilis* HG, hal ini ditandai dengan tingginya aktivitas fitase pada fraksi tersebut.

Karakterisasi Fitase *B. subtilis* HG

pH dan Suhu Optimum

pH optimum enzim adalah pH di mana aktivitas enzim mencapai nilai tertinggi. Aktivitas fitase *B. subtilis* HG pada berbagai pH terdapat pada Tabel 3. Menunjukkan bahwa aktivitas enzim fitase mencapai pH optimum pada pH 7,0, dengan aktivitas 0,2829 U/mL; namun berdasarkan uji Anova satu arah dan LSD, pH optimum fitase *B. subtilis* HG berkisar pada pH 6,5–7,0. Hasil ini berhubungan dengan habitat tanah gunung kapur Holiwood Gresik asal *B. subtilis* HG yang mempunyai pH 7,28 (Yuanita, dkk., 2007). Sesuai Dvorakova (1998), fitase *Bacillus* sp. mempunyai pH optimum pada rentang pH 7,0–7,5. Oleh karena sifat ionik gugus karboksil dan gugus amino mudah dipengaruhi oleh pH, maka daerah katalitik dan konformasi enzim akan berubah oleh perubahan pH. Pada pH optimum, enzim berada pada tingkat ionisasi yang paling sesuai untuk berikatan dengan substrat membentuk kompleks enzim-substrat yang tepat sehingga dapat menghasilkan produk secara maksimal. Konformasi enzim juga dalam bentuk yang stabil sehingga efektivitas pengikatan enzim-substrat tinggi (Simon dan Iqbasan, 2002).

Penentuan suhu optimum dimaksudkan untuk mendapatkan suhu yang tepat, suhu di mana enzim bekerja dengan aktivitas tertinggi. Pada penelitian ini suhu optimum enzim fitase dari *B. subtilis* HG ditentukan dengan cara menentukan aktivitasnya pada berbagai variasi suhu, yakni suhu 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 49, dan 53° C. Aktivitas enzim fitase pada berbagai suhu terdapat pada Tabel 4. Suhu optimum enzim fitase dari *B. subtilis* HG dicapai pada suhu 41° C, dengan aktivitas sebesar 0,301 U/mL. Hal

ini menunjukkan *B. subtilis* HG yang menghasilkan enzim fitase termasuk bakteri mesofil, tumbuh dengan baik pada rentang suhu 25–45° C. Aktivitas relatif enzim meningkat sebanding dengan kenaikan suhu inkubasi dan mencapai nilai maksimal pada suhu 41° C. Akibat adanya peningkatan energi kinetik sehingga mempercepat gerak vibrasi, translasi serta rotasi enzim dan substrat sehingga akan memperbesar peluang keduanya untuk saling berinteraksi dan menghasilkan produk. Kenaikan suhu sampai suhu 41° C, juga akan menyebabkan berubahnya konformasi tiga dimensi enzim menuju ke konformasi yang lebih aktif secara katalitik. Dimungkinkan perubahan faktor sterik dari pusat aktif atau perubahan ikatan nonkovalen pada struktur enzim seperti ikatan hidrogen, ikatan hidrofobik dan hidrofilik sehingga enzim lebih aktif untuk berikatan dengan substrat.

Peningkatan suhu di atas suhu 41° C yang merupakan suhu optimum enzim fitase, akan menurunkan aktivitas enzim. Peningkatan suhu tersebut menyebabkan perubahan konformasi enzim yang mengarah pada perubahan destruktif yang menyebabkan putusannya ikatan yang mempertahankan struktur sekunder dan tersier sehingga terjadi kerusakan pada molekul enzim. Enzim mengalami denaturasi dan kehilangan aktivitas katalitiknya sehingga aktivitas enzim fitase turun pada suhu 45–53° C.

Pengaruh pH dan Suhu terhadap Stabilitas Fitase

Penentuan pengaruh pH terhadap stabilitas fitase dilakukan dengan cara menentukan aktivitas fitase pada pH 4, 7, dan 10 dengan waktu inkubasi yang berbeda, yaitu 0, 30, 60, dan 90 menit. Tabel 5 menunjukkan bahwa enzim fitase *B. subtilis* HG stabil pada pH 7 waktu inkubasi 30 menit dengan kehilangan 2% aktivitasnya dari 100% menjadi 98%; sedangkan pada pH 4 dan 10 dengan waktu inkubasi selama 30 menit, enzim fitase kehilangan 8% dan 6% aktivitasnya.

Penentuan pengaruh suhu terhadap stabilitas enzim dilakukan dengan cara menentukan aktivitas fitase pada suhu 30, 40, dan 50° C dengan waktu inkubasi yang berbeda yaitu 0, 30, 60, dan 90 menit. Enzim mudah terdegradasi oleh panas, jika temperatur meningkat hingga mencapai temperatur tertentu, enzim mulai terurai atau denaturasi. Tabel 6 menunjukkan bahwa fitase *B. subtilis* HG memiliki stabilitas tertinggi pada suhu 30° C waktu inkubasi 30 menit dengan kehilangan 3% aktivitasnya dari 100% menjadi 97%, sedangkan pada suhu 40 dan 50° C selama 30 menit enzim fitase mengalami penurunan aktivitas sebesar 4% dan 10%.

Nilai K_M Dan V_{Maks}

Penentuan aktivitas enzim fitase pada beberapa konsentrasi substrat dilakukan pada kondisi optimum yaitu pada suhu 41° C dan pH 7. Variasi konsentrasi substrat yang digunakan adalah 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 3,5; 4,0 mM (Widowati, 1999). Gambar 2 menunjukkan pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim fitase *B. subtilis* HG. Hasil perhitungan aktivitas variasi konsentrasi substrat menunjukkan bahwa pada konsentrasi substrat rendah, kecepatan reaksinya juga rendah; kecepatan ini akan meningkat dengan meningkatnya konsentrasi substrat. Akan tetapi pada batas konsentrasi tertentu, tidak terjadi kenaikan kecepatan reaksi walaupun konsentrasi substrat diperbesar.

Tetapan Michaelis-Menten (K_M) dan kecepatan maksimum (V_{Maks}) dapat dihitung dengan tranformasi kebalikan ganda persamaan Michaelis-Menten menjadi persamaan Lineweaver-Burk (Gambar 3), hubungan antara ($1/[S]$) dengan ($1/V$) pada persamaan:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{maks}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{maks}}$$

Berdasarkan grafik hubungan antara ($1/[S]$) dengan ($1/V$) pada Gambar 3, diperoleh persamaan regresi linear $Y = 1.5674X + 2.5436$. Grafik tersebut memotong pada sumbu $Y = \frac{1}{V_{maks}}$ dan memotong pada sumbu $X = -\frac{1}{K_M}$, sehingga diperoleh $\frac{1}{V_{maks}} = 2.544$ atau nilai $V_{Maks} = 0.393 \mu\text{mol/ml/menit}$ dan $-1.623 = -\frac{1}{K_M}$ atau nilai K_M sebesar 0,62 mM. Dari besarnya nilai V_{Maks} dikemukakan bahwa pada saat kecepatan 0,393 $\mu\text{mol/ml/menit}$, seluruh situs katalitik enzim jenuh dengan substrat atau semua enzim terdapat sebagai kompleks enzim-substrat. Nilai K_M 0,62 mM berarti bahwa konsentrasi substrat sebesar 0,62 mM pada saat dicapai setengah kecepatan maksimum.

KESIMPULAN

Enzim fitase dari isolat *Bacillus subtilis* Holiwood Gresik mempunyai Mr 36,6 kDa. pH optimum pada kisaran 6,5–7,0, aktivitas 0,272 U/mL pada pH 6,5 dan 0,283 U/mL pada pH 7,0. Suhu optimum fitase pada 41° C dengan aktivitas 0,3013 U/mL. Enzim fitase *B. subtilis* HG stabil pada pH 7 inkubasi selama 30 menit dengan kehilangan 2% aktivitasnya; sedangkan pada suhu 30° C inkubasi selama 30 menit kehilangan 3% aktivitasnya. Nilai konstanta Michaelis-Menten (K_M) enzim fitase hasil isolasi bakteri

B. subtilis HG sebesar 0,62 mM, dan nilai kecepatan reaksi maksimum (V_{Maks}) 0,393 $\mu\text{mol/ml/menit}$.

KEPUSTAKAAN

- Affrifah NS, Chinnan MS, Phillips, 2005. Heat-mouisture Treatments of Cowpea Flour and their Effects on Phytase Inactivation. *Journal of Food Science*. 70(2): E98.
- Beydemir S, Yilmaz H, Ciftci M, Bakan E, Kufrevioglu OI, 2003. Purification of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase From Goose Erythrocytes and Kinetic Properties. *Turk J. Vet Anim Sci*. 27: 1179–85.
- Boyce A, Casey A, Walsh G, 2004. A phytase enzyme based biochemistry practical particularly suited to student undertaking courses in biotechnology and environmental science. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 32: 336–40.
- Deutscher PM, 1990. *Methods in Enzymology*, 182. New York. Academic Press Inc. 285–289.
- Dvorakova J, 1998. Phytase: Sources, preparation and exploitation. *Folia Microbiol*. 3: 323–38.
- Greiner R, Musquiz M, Burbano C, Cuadrado C, Pedrosa MM, Goyoaga C, 2001. Purification and Characterization of Phytate-Degrading Enzym from Germinated Faba Beans (*Vicia faba* Var. Alameda). *J. Agric Food Chem*. 49: 2234–40.
- Greiner R dan Konietzny U, 2006. Phytase for food application. *Food Technol. Biotechnol*. 44(2): 125–40.
- Haros M, Rosell CM, Benedito C, 2001. Use of fungal phytase to improve breadmaking performance of whole wheat bread. *J. Agric Food Chem*. 49: 5450–4.
- Hurrell RF, 2002. Fortification: Overcoming technical and practical barriers. *Journal Nutrition*. 132: 806S–812S.
- Richana N, Irawadi TT, Nur A, Syamsu K, 2008. Isolasi Identifikasi Bakteri Penghasil Xilanase serta Karakterisasi Enzimnya. *Jurnal AgroBiogen* 4(1): 24–34.
- Simon O dan Igbasan F, 2002. In vitro prpperties of phytases from various microbial origins. *International Journal of Food Science and Technology*. 37: 813–22.
- Wang X, Upatham S, Panbangred W, Isarangkul D, Sumpunn P, Wiyakrutta S, Meevootisom V, 2004. Purification, Characterization, Gene Cloning and Sequence Analysis of a Phytase from *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* XY-5. *ScienceAsia* 30: 383–90.
- Widowati S, Andriani D, Riyanti EI, Raharto OP, Sukarno L, 2001. Karakterisasi fitase dari *Bacillus coagulans*. *Prosiding Seminar Hasil Penelitian Rintisan dan Bioteknologi Tanaman*. Hal. 245–55. Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor.
- Yuanita L, Hidayati S, Kusumadajaja AP, 2007. *Isolasi fitase dari mikroorganisme tanah dan penggunaan pada defitinisasi jagung untuk meningkatkan ketercernaan protein dan pati, serta bioavailabilitas mineral (In-Vitro)*. Laporan Penelitian (tahun I- dana DIPA Unesa). Universitas Negeri Surabaya.

Reviewer: **Dr. Sri Sumarsih, M.Si.**