

LAPORAN PRAKTIK KERJA LAPANGAN
PENGUKURAN AKTIVITAS ENZIM, PROTEIN TERLARUT,
AKTIVITAS SPESIFIK ENZIM FITASE ASAL MIKROORGANISME
***L. plantarum* A1-E dan *C. tropicallis* TKD3**

PRAKTIK KERJA LAPANGAN

Dibuat Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Dalam Menyelesaikan Program
Pendidikan Sebagai Ahli Madya Analis Farmasi dan Makanan



Oleh :

Winne Nadia Marsaputri

28161415C

D-III ANALIS FARMASI DAN MAKANAN
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2019

**LAPORAN PRAKTIK KERJA LAPANGAN
DI BALAI PENELITIAN TEKNOLOGI BAHAN ALAM-LIPI
YOGYAKARTA**

PRAKTIK KERJA LAPANGAN

Dibuat Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Dalam
Menyelesaikan Program Pendidikan Sebagai

Ahli Madya Farmasi dan Makanan

oleh :

Winne Nadia Marsaputri

28161415C

D-III ANALIS FARMASI DAN MAKANAN

FAKULTAS FARMASI

UNIVERSITAS SETIA BUDI

SURAKARTA

2019

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan Laporan Praktik Kerja Lapangan. Laporan ini disusun guna memenuhi salah satu persyaratan dalam menyelesaikan Program Studi D-III Analis Farmasi dan Makanan Universitas Setia Budi. Dengan terselesaikannya laporan Praktik Kerja Lapangan ini penulis sampaikan rasa terima kasih kepada :

1. Balai Penelitian Teknologi Bahan Alam–LIPI Yogyakarta yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk melakukan Praktik Kerja Lapangan.
2. Prof. Dr. R.A. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt., selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.
3. Mamik Ponco Rahayu, M.Si., Apt., selaku kepala Program Studi D-III Analis Farmasi dan Makanan Universitas Setia Budi Surakarta.
4. Lusty Istiqomah, S.Pt., M.Biotech., selaku pembimbing lapangan Praktik Kerja Lapangan di Balai Penelitian Teknologi Bahan Alam–LIPI Yogyakarta yang telah memberikan arahan dan masukan kepada penulis dalam melaksanakan praktik kerja lapangan hingga mendapatkan hasil praktik yang dapat dilaporkan.
5. Ana Indrayati, S.Si., M.Si., selaku dosen pembimbing yang telah memberikan arahan dan masukan kepada penulis dalam melaksanakan

Praktik Kerja Lapangan di Balai Penelitian Teknologi Bahan Alam–
LIPI Yogyakarta.

6. Segenap Staf dan karyawan Balai Penelitian Teknologi Bahan Alam–
LIPI Yogyakarta yang telah banyak memberikan bimbingan sehingga
dapat menyelesaikan Praktik Kerja Lapangan ini dengan baik dan
lancar.

Penulis menyadari bahwa penulisan laporan yang telah penulis susun
ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu saran serta nasihat yang
membangun sangat penulis harapkan. Akhir kata penulis berharap semoga
laporan ini dapat bermanfaat khususnya bagi penulis sendiri dan umumnya
dapat menambah pengetahuan dan wawasan bagi para pembaca.

Gunungkidul, April 2019

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR LAMPIRAN.....	viii
INTISARI.....	ix
ABSTRACT.....	x
BAB I.....	1
PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Waktu dan Tempat PKL.....	2
C. Tujuan PKL	3
D. Manfaat PKL	3
BAB II.....	5
TINJAUAN PUSTAKA	5
A. Sejarah.....	5
B. Tugas dan Fungsi.....	7
C. Struktur Organisasi.....	8
D. Visi dan Misi	9
E. Fitat	11
F. Enzim Fitase.....	11
1. Definisi Fitase.....	11
2. Sumber Fitase	12
3. Karakteristik Fitase.....	13
G. Khamir (<i>Yeast</i>)	13
H. Bakteri Asam Laktat (BAL)	13
I. Protein	14
J. Metode Lowry	15
K. Spektrofotometri Uv-Vis	16

BAB III	17
PELAKSANAAN PRAKTIK KERJA LAPANGAN	17
A. Tahap Kegiatan Yang Dilaksanakan	17
B. Alat dan Bahan	17
1. Alat	17
2. Bahan.....	17
C. Metode Penelitian.....	18
1. Preparasi Media	18
1.1 Media pertumbuhan khamir	18
1.2 Media tumbuh BAL	19
2. Preparasi isolat	20
2.1 Isolat Khamir.....	20
2.2 Isolat BAL	20
3. Pengamatan morfologi isolat.....	20
4. Produksi Enzim Fitase dengan metode Solid State Fermentation.....	21
5. Ekstraksi Enzim Fitase	21
6. Pengujian Aktivitas Fitase	22
7. Penentuan Protein Terlarut.....	23
8. Purifikasi parsial enzim	24
8.1 Fitase dari khamir (<i>Candida tropicalis</i> TKd3)	24
8.2 Fitase dari BAL (<i>Lactobacillus plantarum</i> A1-E)	25
BAB IV	27
HASIL DAN PEMBAHASAN.....	27
A. Pengukuran Aktivitas Fitase, Kadar Protein dan Aktivitas Spesifik.....	27
BAB V.....	34
KESIMPULAN DAN SARAN.....	34
A. Kesimpulan.....	34
B. Saran.....	34
DAFTAR PUSTAKA	36
LAMPIRAN.....	38

DAFTAR TABEL

Tabel 1 Aktivitas enzim fitase <i>L. plantarum</i> A1-E	27
Tabel 2 Kadar protein terlarut dari fitase <i>L. plantarum</i> A1-E	28
Tabel 3 Aktivitas spesifik fitase <i>L. plantarum</i> A1-E	29
Tabel 4 Aktivitas enzim fitase <i>C. tropicalis</i> TKd3	30
Tabel 5 Kadar protein terlarut dari fitase <i>C. tropicalis</i> TKd3.....	31
Tabel 6 Aktivitas spesifik fitase <i>C. tropicalis</i> TKd3.....	31

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Gambar Proses produksi enzim fitase, pemurnian parsial dan dialysis enzim	38
Lampiran 2 Data Kurva Standar KH_2PO_4	39
Lampiran 3 Data Kurva Standar Metode Lowry.....	39
Lampiran 4 Data Pengukuran <i>Lactobacillus plantarum</i> A1-E	40
Lampiran 5 Data Pengujian <i>Candida tropicalis</i> TKd3	41

INTISARI

Fitase (*myo-inositol hexakisfosfat fosfohidrolase*) merupakan enzim yang dapat memecah senyawa fitat menjadi mio-inositol dan fosfor anorganik (asam fosfat). Fitase telah banyak diisolasi dari berbagai mikroba, dalam penelitian ini enzim fitase diisolasi dari mikroorganisme khususnya bakteri asam laktat *L. plantarum* dan yeast (khamir) *C. tropicalis*.

Dalam menghasilkan fitase seleksi BAL dilakukan pada media MRS *broth* dan yeast (khamir) pada media CYG *broth*. Pemurnian fitase dilakukan secara parsial dan dialisis. Fitase tersebut diukur aktivitas fitase, kadar protein terlarut, dan aktivitas spesifiknya. Hasil menunjukkan bahwa pada BAL aktivitas fitase yang didapatkan sebesar 3,721% dan kadar protein terlarut menunjukkan hasil 42,960%, sehingga diperoleh aktivitas spesifik 0.096%. Hasil yeast (khamir) menunjukkan bahwa aktivitas fitase yang didapatkan 4,230% dan kadar protein terlarut sebesar 22.924%, sehingga diperoleh aktivitas spesifik 0.481%.

Dapat disimpulkan bahwa jenis substrat dan metode purifikasi tidak mempengaruhi aktivitas enzim, kadar protein terlarut, dan aktivitas spesifik enzim fitase asal mikroorganisme *L. plantarum* A1-E maupun *C. tropicalis* TKd3.

Kata kunci : Fitase, BAL, yeast (khamir), aktivitas fitase, protein terlarut, aktivitas spesifik

ABSTRACT

Phytase (*myo-inositol hexakisfosfat fosfohidrolase*) is an enzyme that can break the phytate compounds into mio-inositol and fosfor inorganic (phosphate acids). Phytase has been much isolated from the various microbes, in the study phytase enzymes are isolated from microorganisms especially the latic acid bacteria *L. plantarum* and yeast *C. tropicalis*.

The BAL selection fittings were done to MRS broth media and yeast in the CYG broth media. Partial flotation and dialysis are required. It measures phytase enzyme activity, dissolved protein levels, and specific activity. The result indicates that a sample of fifty activity generated by 3,721% and the dissolved protein level is 42,960%, that resulted in specific activity 0,096%. Yeast result suggests that the rubbing activity paid for 4,230% and the salinity of dissolved protein levels by 22.924%, that would involve specific activity 0,481%.

It's almost inconclusive that the type of substrate and purification methods not affect enzyme activity, dissolved protein levels, and the specific activity of the phytase enzyme microorganisms from both *L. plantarum* A1-E and *C. tropicalis* TKd3.

Keywords : Phytase, BAL, yeast, activity of phytase, dissolved proteins, specific activities.

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Program Studi D-III Analis Farmasi dan Makanan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta mempunyai standar kurikulum yang ditetapkan. Praktik Kerja Lapangan (PKL) merupakan salah satu syarat untuk menempuh gelar ahli madya. Adanya PKL diharapkan dapat menghasilkan lulusan ahli madya yang berkualitas. Maksud kegiatan ini agar mahasiswa mendapatkan pengalaman sebelum memasuki dunia kerja yang sesungguhnya, mengetahui keterampilan dan pengetahuan yang perlu dikembangkan dan perlu dipertahankan.

Kegiatan PKL dapat memberikan kontribusi yang berarti bagi perkembangan mahasiswa untuk mempersiapkan diri sebaik-baiknya sebelum memasuki dunia kerja dan perkembangan kompetensi. Salah satu upaya peningkatan sumber daya manusia khususnya dalam pendidikan perguruan tinggi adalah melalui Program Praktik Kerja Lapangan yang merupakan sarana penting bagi pengembangan diri dalam dunia kerja yang nyata.

Asam fitat merupakan komponen utama dari semua bibit tanaman, yang merupakan 1-3% berat banyak sereal dan minyak sayur dan biasanya terhitung 60-90% dari total fosfor (Irianingrum, 2009). Fitat juga mampu mengikat pati dan protein sementara mencegah asimilasi mereka melalui sistem pencernaan. Pengurangan Efektif asam fitat dapat diperoleh melalui tindakan baik

enzimatis dan non enzimatis degradasi. Fitase adalah fosfatase asam histidin yang mengkatalisis hidrolisis asam fitat yang merupakan dominan bentuk fosfor dalam biji-bijian sereal, minyak sayur, dan kacang-kacangan. Enzim ini tersebar luas di alam karena ditemukan pada hewan, tumbuhan, dan mikroorganisme. Kemampuan untuk mengkatalisis pelepasan dari fitat menjadikan fitase sehingga memiliki berbagai aplikasi pada hewan dan nutrisi manusia. Penambahan fitase pada pakan hewan dapat mengurangi ekskresi fosfor hewan monogastrik ke lingkungan sehingga memberikan efek terhadap perlindungan lingkungan (melindungi perairan dari autrofikasi), dan dapat meningkatkan ketersediaan mineral, *trace element*, asam amino, dan energi baik bagi hewan ataupun manusia (Afinah *et al.*, 2010).

Tujuan penelitian ini untuk 1) mengetahui aktivitas fitase dari mikroorganisme bakteri asam laktat (*Lactobacillus plantarum* A1-E) dan khamir (*Candida tropicalis* TKd3), 2) menentukan kadar protein terlarut enzim fitase, dan 3) melakukan purifikasi enzim fitase secara parsial.

B. Waktu dan Tempat PKL

1. Waktu Pelaksanaan

Pelaksanaan PKL di mulai tanggal 1 April 2019 dan berakhir tanggal 30 April 2019. Pelaksanaan Praktik Kerja Lapangan (PKL) dimulai dari hari Senin–Kamis pukul 07.30–16.00 WIB. Sedangkan pada hari Jumat pukul 07.30–16.30 WIB.

2. Tempat Pelaksanaan

Pelaksanaan PKL bertempat di Balai Penelitian Teknologi Bahan Alam–LIPI Yogyakarta, yang beralamat di Jl. Jogja–Wonosari Km 31,5, Ds. Gading, Kec. Playen, Kab. Gunungkidul, Yogyakarta.

C. Tujuan PKL

Program PKL Diploma Analisa Farmasi dan Makanan memiliki tujuan sebagai berikut:

Tujuan Umum:

1. Meningkatkan pengetahuan, pengalaman, kemampuan dan keterampilan mahasiswa sesuai dengan bidang ilmunya.
2. Mengarahkan mahasiswa untuk menemukan permasalahan maupun data yang berguna dalam penulisan tugas akhir.
3. Mendapatkan masukan untuk umpan balik (*feedback*) dalam usaha penyempurnaan kurikulum yang sesuai dengan tuntutan dunia kerja.

Tujuan Khusus:

1. Mengetahui aktivitas fitase dari mikroorganisme bakteri asam laktat (*Lactobacillus plantarum* A1-E) dan khamir (*Candida tropicalis* Tkd3) pada substrat bungkil kedelai dan pollard.
2. Menentukan kadar protein terlarut enzim fitase
3. Melakukan purifikasi enzim fitase secara parsial.

D. Manfaat PKL

Program PKL diharapkan mampu memberikan manfaat

bagi pihak-pihak yang terlibat seperti Mahasiswa Diploma Analis Farmasi dan Makanan dan instansi terkait. Manfaat yang diharapkan antara lain:

Bagi Mahasiswa:

1. Melatih keterampilan mahasiswa sesuai bidang ilmu masing-masing dengan berdasarkan pengetahuan yang diperoleh dari selama proses perkuliahan.
2. Mengetahui praktik dunia kerja mulai dari perencanaan, pengorganisasian, pelaksanaan dan evaluasi program pada unit-unit kerja dengan mengembangkan wawasan berpikir keilmuan kreatif dan inovatif.
3. Membuat laporan Praktik Kerja Lapangan berdasarkan data yang diperoleh dari pengamatan yang selanjutnya dapat dikembangkan oleh mahasiswa dalam pembuatan tugas akhir.
4. Ikut serta dalam penelitian aktivitas fitase dan kadar protein.

Bagi Instansi di lingkungan Pemerintah:

1. Memperoleh tenaga kerja yang diharapkan dapat berperan serta dalam pelaksanaan pekerjaan dan pemecahan permasalahan yang ada di instansi dimana mahasiswa melaksanakan Praktik Kerja Lapangan.
2. Menumbuhkan kerjasama yang saling menguntungkan, dinamis dan bermanfaat dengan institusi pendidikan, dimana Instansi dapat memperoleh informasi terkait dengan perkembangan ilmu yang sedang berkembang.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Sejarah

Balai Penelitian Teknologi Bahan Alam Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia–Yogyakarta, disingkat BPTBA LIPI Yogyakarta, sebelumnya bernama UPT Balai Pengembangan Proses dan Teknologi Kimia (BPPTK) merupakan satuan kerja setingkat eselon III pada Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia di bawah Kedeputan bidang Ilmu Pengetahuan Teknik (IPT) LIPI. Perubahan nama ini bagian dari reorganisasi yang bertujuan untuk memperluas tugas pokok dan fungsi di bidang penelitian sehingga cakupan kegiatan menjadi lebih komprehensif, tidak hanya terbatas pada pengembangan (developing) tapi juga menyasar pada penelitian dasar (*basic research*). Reorganisasi dari BPPTK menjadi BPTBA efektif berlaku sejak 25 Februari 2016 sesuai Peraturan Kepala LIPI nomor 6 tahun 2016 tanggal 25 Februari 2016 tentang Organisasi dan Tata Kerja Balai Penelitian Teknologi Bahan Alam. BPTBA LIPI berlokasi di Jl. Jogja–Wonosari KM 31,5 Desa Gading, Kecamatan Playen, Kabupaten Gunungkidul, D.I.Yogyakarta (BPTBA, 2019).

Sejarah berdirinya BPTBA LIPI Yogyakarta diawali pada 26 Juni 1983 dengan dibentuknya Stasiun Percontohan dan Pengembangan Teknologi

Pembuatan Bahan Makanan Campuran Ternak untuk sapi (SPPT–BMCT), Gading, Playen, Gunungkidul, D.I.Yogyakarta. Pembentukan SPPT-BMCT bertujuan untuk memenuhi kebutuhan pakan ternak terutama ruminansia di Gunungkidul dan sekitarnya. Kegiatan unggulan pada stasiun percontohan ini adalah penelitian Bahan Makanan Campuran Ternak untuk sapi. Satu unit SPPT LIPI juga berada di Gunungsempu, Kecamatan Kasihan, Kabupaten Bantul, D.I.Yogyakarta yang fokus pada pengolahan dan pelatihan Tahu Tempe sehingga disebut sebagai SPPT Tahu Tempe yang dibentuk berdasarkan hasil kerjasama Koperasi Tahu Tempe Indonesia (KOPTI) dan LKN LIPI (BPTBA, 2019).

Pada 8 Mei 1987 dengan berkembangnya kegiatan riset maka SPPT-BMCT berubah nama menjadi Balai Diseminasi Hasil Penelitian dan Pengembangan Bahan Olahan Kimia (BBOK). Fokus kegiatan BBOK tidak hanya pada bidang pakan ternak saja tetapi ditambah dengan kegiatan pada bidang olahan pangan. Bahan Baku dan Olahan Kimia (BBOK) LIPI memiliki tiga unit yang berada di tiga lokasi yaitu Lampung, Bandung dan Yogyakarta. Unit BBOK LIPI yang berkedudukan di Lampung merupakan satuan kerja terbesar di antara ketiga satuan kerja di atas. Kegiatan utamanya adalah implementasi teknologi pada bidang pertanian. Sementara unit yang berada di Cisit, Bandung menjadi pusat kegiatan administrasi dan eksperimen laboratorium. Sedangkan unit yang berada di Gunungkidul, Yogyakarta, diarahkan pada pengembangan teknologi pengolahan pangan (BPTBA, 2019).

Selanjutnya pada 12 Juni 2012, melalui Surat Keputusan Kepala LIPI nomor 1022/M/2002, tanggal 12 Juni 2002 tentang organisasi dan tata kerja Balai Lembaga Kimia Nasional (LKN)–Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) pengembangan proses dan teknologi kimia, dilakukanlah reorganisasi BBOK dengan melebur tiga unit BBOK yang ada di Lampung, Bandung dan Yogyakarta menjadi Balai Pengembangan Proses dan Teknologi Kimia Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia–Yogyakarta, disingkat UPT BPPTK LIPI Yogyakarta. UPT BPPTK LIPI secara struktur berada di bawah pembinaan Pusat Penelitian Kimia LIPI (Eselon 2) (BPTBA, 2019).

UPT BPPTK LIPI melaksanakan pengembangan, pemanfaatan dan penerapan hasil penelitian di bidang proses dan teknologi kimia dan lingkungan, pangan dan pakan, farmasi dan teknologi lingkungan. Semakin majunya kegiatan pengembangan dan riset di UPT BPPTK LIPI maka sesuai Peraturan Kepala LIPI nomor 6 tahun 2016 tanggal 25 Februari 2016 tentang Organisasi dan Tata Kerja Balai Penelitian Teknologi Bahan Alam, maka nama UPT BPPTK berubah nama menjadi Balai Penelitian Teknologi Bahan Alam (BPTBA) LIPI (BPTBA, 2019).

B. Tugas dan Fungsi

BPTBA LIPI mempunyai tugas melakukan penelitian di bidang teknologi bahan alam. Dalam melaksanakan tugas, BPTBA LIPI menyelenggarakan fungsi :

1. Pelaksanaan penelitian di bidang teknologi bahan alam;
2. Pemanfaatan hasil penelitian di bidang teknologi bahan alam;

3. Pengelolaan sarana dan prasarana penelitian;
4. Pelaksanaan layanan jasa dan informasi;
5. Diseminasi hasil penelitian di bidang teknologi bahan alam; dan
6. Pelaksanaan urusan tata usaha dan rumah tangga (BPTBA, 2019).

C. Struktur Organisasi

Dalam menjalankan tugas dan fungsinya BPTBA LIPI dipimpin oleh Kepala dibantu dengan empat struktural eselon 4 yang terdiri dari:

1. Sub bagian Tata Usaha, mempunyai tugas melakukan urusan kepegawaian, keuangan, umum, dan kerumahtanggaan.
2. Seksi Pemanfaatan Teknologi, mempunyai tugas melakukan pemanfaatan hasil penelitian teknologi bahan alam.
3. Seksi Sarana dan Prasarana Teknis, mempunyai tugas melakukan perencanaan, pengelolaan, dan pengembangan sarana dan prasarana penelitian.
4. Seksi Pelayanan Jasa dan Informasi, mempunyai tugas melakukan pelayanan jasa dan informasi, dokumentasi, promosi, dan diseminasi hasil penelitian teknologi bahan alam, serta kerja sama.

Fungsi penelitian dan pengembangan dijalankan oleh kelompok fungsional peneliti tiga yang tergabung dalam kelompok penelitian (Keltian). Saat ini BPTBA mempunyai tiga Keltian yaitu Keltian Teknologi Proses Pangan Lokal, Keltian Teknologi Bioaditif Pakan dan Keltian Proses Teknologi Kimia Bahan Alam yang masing-masing dipimpin oleh Kepala Keltian.

Struktur Organisasi

Kepala BPTBA	: Hardi Julendra, S.Pt.,Msc
Kepala Sub Bagian Tata Usaha	: Myta Damayanti Soeharto, SE
Kepala Seksi Sarana dan Prasarana	: Wahyu Setyo Prabowo, M.T.
Kepala Proses Bahan Alam	: Dr. Khoirun Nisa
Kepala Teknologi Bioaditif Pakan	: Dr. Ahmad Sofyan
Kepala Keltian Pangan Fungsional	: Yuniar Khasanah. M.Sc
Kepala Teknologi Pengemasan	: Dr. Asep Nurhikmat
Kepala Teknologi Kimia & Lingkungan	: Tri Hadi Jatmiko, MT.

D. Visi dan Misi

Visi

Menjadi lembaga ilmu pengetahuan berkelas dunia dalam penelitian, pengembangan dan pemanfaatan ilmu pengetahuan untuk meningkatkan daya saing bangsa.

Misi

1. Menciptakan invensi ilmu pengetahuan yang dapat mendorong inovasi dalam rangka meningkatkan daya saing ekonomi bangsa;
2. Mengembangkan ilmu pengetahuan yang bermanfaat untuk konservasi dan pemanfaatan Sumber Daya berkelanjutan;
3. Meningkatkan pengakuan internasional dalam bidang ilmu pengetahuan;
4. Meningkatkan kualitas SDM Indonesia melalui aktivitas Ilmiah

Untuk menjalankan visi misi LIPI, BPTBA membuat Rencana Kegiatan Lima Tahun dengan tiga sasaran penting yaitu:

1. Terbentuknya Pusat Unggulan Pengemasan Makanan Tradisional
2. Terbentuknya Pusat Kajian Teknologi Bahan Alam untuk Food (pangan), Feed (pakan) and Fuel (bahan bakar)
3. Terbentuknya Pusat Kajian Integrated Farming System (system pertanian terpadu).

Sejak berdiri banyak capaian penting yang didapatkan BPTBA LIPI baik dalam hal Publikasi Ilmiah, Kerjasama Kelembagaan/ Riset baik skala nasional maupun internasional, Hak Kekayaan Intelektual berupa Paten dll serta keberhasilan pendampingan UMKM dan industri dalam proses alih teknologi dan kerjasama pengembangan produk. Produk-produk unggulan yang telah diadopsi oleh industri kecil dan menengah seperti gudeg kaleng oleh CV Buana Citra Sentosa (Gudeg Bu Tjitro 1925), Gudeg Bu Citro Andrawinaloka, Gudeg Bu Slamet Wijilan, Sayur Lombok Ijo dan Gudeg Daun Pepaya oleh RM Niela Sari, Mangut Lele oleh KOLIGA, Makanan Khas Kutai dalam Kaleng oleh RM Warung Bu Ageng, Sambel pecel kaleng oleh CV Sri Wiji Utami dan Tempe Bacem kaleng oleh PT Umiyako Javafood. Capaian penting lain pada bidang peternakan adalah konsep sistem pertanian terpadu yang banyak diadopsi oleh kelompok tani ternak seperti Kelompok Ternak Tanjung Lurah di Tanah Datar Sumatera Barat, dan beberapa wilayah lain di Indonesia. Di bidang proses kimia bahan alam salah satu teknologi yang banyak diadopsi

antara lain pembuatan sabun herbal transparan, olahan teh, sirup dari bahan herbal lokal (BPTBA, 2019).

E. Fitat

Asam fitat (*myo-inositol hexakisphosphate*) merupakan bentuk penyimpanan fosfor terbesar pada tanaman serealia dan leguminosa (Kumar *et al.*, 2010). Di dalam biji, fitat merupakan sumber fosfor dan inositol utama bagi tanaman, terdapat dalam bentuk garam kalium, kalsium, magnesium, dan logam lain. Pada kondisi alami, asam fitat akan membentuk ikatan baik dengan mineral bervalensi dua (Ca, Mg, Fe) maupun protein menjadi senyawa yang sukar larut (Arief *et al.*, 2011).

Struktur kimia fitat memiliki struktur yang sangat stabil. Dalam bentuk fosfat organik memiliki kandungan fosfat yang tinggi. Dalam kondisi fisiologi normal asam fitat membentuk *chelate* dengan mineral-mineral esensial seperti kalsium, magnesium, besi dan seng. Asam fitat seringkali berkaitan dengan asam-asam amino atau menghambat enzim-enzim pencernaan (Irianingrum, 2009).

F. Enzim Fitase

1. Definisi Fitase

Fitase adalah enzim yang mengkatalis *myo-inositol hexakisphosphate* (fitat) menjadi *orthophosphate* anorganik dan serangkaian *phosphoric* yang lebih rendah (*inositol pentaphosphate* menjadi *monophosphate*) dan akhirnya menjadi *myo-inositol* bebas (Selle & Ravindran, 2007).

2. Sumber Fitase

Selle & Ravindran (2007) dan Khalid *et al.* (2013) mengemukakan bahwa terdapat empat sumber fitase, yaitu : fitase yang bersumber dari usus hewan, fitase ditemukan dalam sekresi yang dihasilkan oleh usus hewan (fitase asal hewan); fitase yang berasal dari mikroba dalam saluran pencernaan (misalnya seperti dalam ternak ruminansia); fitase endogen dari tanaman/bahan pakan; fitase yang diproduksi oleh mikroorganisme. Fitase yang bersumber dari mikroba paling banyak digunakan untuk tujuan komersial (Khalid *et al.* 2013).

Beutler (2009) mengatakan bahwa terdapat beberapa jenis fitase yang dapat dikomersialkan dan digunakan sebagai pakan imbuhan hasil isolasi dari jamur, ragi, dan bakteri. Jamur dan bakteri adalah sumber fitase yang paling penting, perbedaan sumber fitase mengakibatkan perbedaan sifat fisik dan kimia fitase dan perbedaan pengaruh ketika diberikan kepada ternak monogastrik.

El-Toukhy *et al.*, (2013) telah mengisolasi, memurnikan, dan mengkarakterisasi fitase dari tanah dan diperoleh tiga strain yang salah satunya teridentifikasi secara morfologi dan dikonfirmasi secara molekuler sebagai *Bacillus subtilis* MJA dengan aktivitas fitase yang tinggi.

Muthuraman *et al.*, (2013) juga melakukan isolasi fitase bakteri dari kotoran unggas dan mengoptimasi dari kultur tingkat produksi fitase dan diketahui bahwa bahwa diantara ketiga isolat, *Pseudomonas fluorescens* memiliki aktivitas sangat tinggi dalam mendegradasi fitat. Dedak gandum,

ekstrak ragi dan kalium dihidrogen fosfat pada pH 6 yang masing-masing diidentifikasi sebagai sumber karbon, nitrogen, dan fosfat yang terbaik.

Nurhikma *et al.*, (2017) telah mengisolasi dan menapis 10 isolat bakteri penghasil fitase dari tanaman jagung yang empat diantaranya memiliki Indeks Fiatik (IF) tertinggi dari masing-masing organ.

3. Karakteristik Fitase

Fitase merupakan protein dengan berat molekul tinggi sehingga sensitif terhadap kelembaban dan suhu yang tinggi. Hal tersebut perlu diperhatikan ketika dilakukan pemrosesan pakan serta ketika dilakukan proses penyimpanan fitase sehingga fitase harus disimpan di tempat gelap, dingin, dan kering (Slominski *et al.* 2007).

G. Khamir (Yeast)

Khamir merupakan mikroorganisme dari golongan fungi yang termasuk uniseluler, biasanya hidup sebagai saprofit maupun parasit (Widiastutik, 2013). Khamir banyak di temukan di berbagai tempat terutama pada tumbuhan seperti buah-buahan, biji-bijian, dan makanan yang mengandung gula. Khamir juga ditemukan di tanah, udara, dan kulit binatang. Beberapa khamir dapat dimanfaatkan dalam berbagai bidang industri, terutama dalam bidang fermentasi makanan maupun minuman (Mahreni, 2011).

H. Bakteri Asam Laktat (BAL)

Bakteri asam laktat adalah bakteri yang mampu memfermentasikan karbohidrat untuk memproduksi asam laktat dalam jumlah yang besar. Ciri-ciri asam laktat adalah bereaksi positif pada pewarnaan Gram, bereaksi negatif

pada uji katalase, dan tidak membentuk spora (Ramadhan *et al.*, 2012). Bakteri asam laktat menghasilkan antibakteri berupa asam organik, bakteriosin, metabolit primer, hidrogen peroksida, diasetil, karbondioksida, asetaldehid, dan menurunkan pH lingkungannya dengan mengeksresikan senyawa yang mampu menghambat patogen (Usmiati, 2012).

I. Protein

Protein merupakan salah satu senyawa yang berupa makromolekul, yang terdapat dalam setiap organisme, dengan karakteristik yang berbeda-beda. Protein yang ditemukan kadang-kadang berkonjugasi dengan makromolekul atau mikromolekul seperti lipid, polisakarida dan mungkin fosfat. Protein terkonjugasi yang dikenal antara lain nukleoprotein, fosfoprotein, metaloprotein, lipoprotein, flavoprotein dan glikoprotein. Protein yang diperlukan organisme dapat diklasifikasikan menjadi dua golongan utama, ialah pertama/ protein sederhana, yaitu protein yang apabila terhidrolisis hanya menghasilkan asam amino/ dan kedua protein terkonjugasi, yaitu protein yang dalam hidrolisis tidak hanya menghasilkan asam amino, tetapi menghasilkan juga komponen organik ataupun komponen anorganik, yang disebut "gugus prostheti". Protein dapat dibedakan berdasarkan pada jenis ikatan peptida antar molekul asam amino, yaitu protein primer, protein sekunder, protein tertier dan protein kuaterner. Protein primer merupakan polimer asam amino yang berbentuk rantai panjang, terdapat dalam sel hewan antara lain sebagai kollagen dan elastin. Protein sekunder adalah polimer asam amino rantai polipeptida yang membentuk struktur helix seperti keratin yang

terdapat dalam rambut, tanduk dan wool. Protein tertier adalah polimer asam amino dalam bentuk globuler, seperti yang terdapat dalam enzim, muthormon dan protein pembawa oksigen (Sumarno, 2002).

J. Metode Lowry

Metode Lowry merupakan pengembangan dari metode Biuret. Dalam metode ini terlibat 2 reaksi. Awalnya, kompleks Cu(II)-protein akan terbentuk sebagaimana metode biuret, yang dalam suasana alkalis Cu(II) akan tereduksi menjadi Cu(I). Ion Cu^+ kemudian akan mereduksi reagen Folin-Ciocalteu, kompleks phosphomolibdat-phosphotungstat, menghasilkan *heteropoly-molybdenum blue* akibat reaksi oksidasi gugus aromatik (rantai samping asam amino) terkatalis Cu, yang memberikan warna biru intensif yang dapat dideteksi secara kolorimetri. Kekuatan warna biru terutama bergantung pada kandungan residu tryptophan dan *tyrosine*-nya. Keuntungan metode Lowry adalah lebih sensitif (100 kali) daripada metode Biuret sehingga memerlukan sampel protein yang lebih sedikit. Batas deteksinya berkisar pada konsentrasi 0.01 mg/mL. Namun metode Lowry lebih banyak interferensinya akibat kesensitifannya (Lowry *et al.*, 1951).

Beberapa zat yang bisa mengganggu penetapan kadar protein dengan metode Lowry ini, diantaranya buffer, asam nuklet, gula atau karbohidrat, deterjen, gliserol, Tricine, EDTA, Tris, senyawa-senyawa kalium, sulfhidril, disulfida, fenolat, asam urat, guanin, xanthine, magnesium, dan kalsium. Interferensi agen-agen ini dapat diminimalkan dengan menghilangkan interferens tersebut. Sangat dianjurkan untuk menggunakan blanko untuk

mengkoreksi absorbansi. Interferensi yang disebabkan oleh deterjen, sukrosa dan EDTA dapat dieliminasi dengan penambahan SDS atau melakukan preparasi sampel dengan pengendapan protein (Lowry *et al.*, 1951).

Metode Lowry-Folin hanya dapat mengukur molekul peptida pendek dan tidak dapat mengukur molekul peptida panjang (Alexander dan Griffiths, 1992). Prinsip kerja metode Lowry adalah reduksi Cu^{2+} (reagen Lowry B) menjadi Cu^+ oleh tirosin, triptofan, dan sistein yang terdapat dalam protein. Ion Cu^+ bersama dengan fosfotungstat dan fosfomolibdat (reagen Lowry E) membentuk warna biru, sehingga dapat menyerap cahaya (Lowry *et al.*, 1951).

K. Spektrofotometri Uv-Vis

Spektrofotometri merupakan suatu metoda analisa yang didasarkan pada pengukuran serapan sinar monokromatis oleh suatu lajur larutan berwarna pada panjang gelombang spesifik dengan menggunakan monokromator prisma atau kisi difraksi dengan detektor *fototube*. Spektrofotometer adalah alat untuk mengukur transmittan atau absorban suatu sampel sebagai fungsi panjang gelombang (Yoky, 2009).

BAB III

PELAKSANAAN PRAKTIK KERJA LAPANGAN

A. Tahap Kegiatan Yang Dilaksanakan

Pada tahap ini kegiatan yang dilakukan berkaitan dengan pengujian aktivitas enzim fitase dan penentuan protein terlarut, serta purifikasi enzim secara parsial di Laboratorium BPTBA-LIPI. Penulis telah melakukan kegiatan antara lain:

1. Pengujian aktivitas fitase
2. Penentuan kadar protein terlarut
3. Purifikasi parsial enzim

B. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah tabung reaksi, *beaker glass*, erlenmeyer, gelas ukur, labu takar, mikro pipet, tip mikro pipet, *vortex mixer*, *falcon tube*, Spektrofotometer, *waterbath*, mikroskop, kaca preparat steril, *cover glass*, sentrifuge, pengaduk magnetik, autoklaf, *hotplate stirrer*.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah media CYG *broth*, media MRS *broth*, air destilasi, isolat *Candida tropicalis* TKd3, isolat

Lactobacillus plantarum A1-E, substrat pollard, substrat bungkil kedelai (*Soybean Meal*, SBM), larutan $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2%, kain muslin (blacu), natrium asetat 0,1 M (pH 4), natrium fitat 1,5 mM, trikloroasetat (TCA) 10%, ferro sulfat, ammonium molibdat 10 mM, asam sulfat 5 N, KH_2PO_4 , buffer natrium asetat 0,1 M pH 4, larutan standar *Bovine Serum Albumine* (BSA), aquadest, $\text{CuSO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 1%, $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2%, NaOH 0,02 M, Na_2CO_3 4%, reagen Folin Ciaocalteu's Phenol 10%, buffer sodium asetat-asam asetat 0,1 M (pH 4), BaCl_2 1%, buffer sodium asetat-asam asetat 0,2 M (pH 6).

C. Metode Penelitian

1. Preparasi Media

1.1 Media pertumbuhan khamir

- 1.1.1 Media tumbuh untuk khamir berupa *Chloramphenicol Yeast Glucose* disiapkan dengan melarutkan media CYG *broth* (Merck) kedalam air destilasi (25,2 g/L)
- 1.1.2 Larutan media CYG *broth* kemudian ditempatkan pada erlenmeyer dan diletakkan diatas *plate stirrer* lalu dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* hingga larut sempurna.
- 1.1.3 Larutan kemudian disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm.
- 1.1.4 Media CYG agar disiapkan dengan melarutkan media CYG *agar* (Merck) kedalam air destilasi (40 g/L)

- 1.1.5 Larutan tersebut dihomogenkan dan dipanaskan menggunakan *hotplate stirrer* sampai mendidih. Lalu disteriliasi dengan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C dengan tekanan 1 atm.

1.2 Media tumbuh BAL

- 1.1.6 Media tumbuh untuk BAL berupa MRS *broth* disiapkan dengan melarutkan media MRS *broth* (Merck) kedalam air destilasi (52 g/L)
- 1.1.7 Larutan media MRS *broth* kemudian ditempatkan kedalam erlenmeyer dan diletakkan diatas *plate stirrer* lalu dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* hingga larut sempurna.
- 1.1.8 Larutan kemudian disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm.
- 1.1.9 Media MRS disiapkan dengan melarutkan media MRS *agar* (Merck) kedalam air destilasi (62 g/L)
- 1.1.10 Larutan media tersebut dihomogenkan dan dipanaskan menggunakan *hotplate stirrer* sampai mendidih. Lalu disteriliasi dengan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C dengan tekanan 1 atm.

2. Preparasi isolat

2.1 Isolat Khamir

2.1.1 Isolat *Candida tropicalis* TKd3 dari biakan stok cair mengandung gliserol pada penyimpanan suhu beku (-20°C) *dithawing* pada suhu refrigerator (4°C) hingga mencair.

2.1.2 Sebanyak 100 µL kultur cair *C. tropicalis* TKd3 diinokulasi kedalam 1 mL media CYG *broth* (10%) kemudian dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam.

2.2 Isolat BAL

2.1.3 Isolat *Lactobacillus plantarum* A1-E dari biakan stok cair mengandung gliserol pada penyimpanan suhu beku (-20°C) *dithawing* pada suhu refrigerator (4°C) hingga mencair.

2.1.4 Sebanyak 100 µL kultur cair BAL diinokulasi kedalam 1 mL media MRS *broth* (10%) kemudian dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

3. Pengamatan morfologi isolat

3.1 Isolat khamir dan BAL diamati secara mikroskopis dibawah mikroskop (OPTILAB).

3.2 Sebanyak 2 µL kultur cair khamir ditetaskan pada kaca preparat steril kemudian ditutup dengan *cover glass*.

3.3 Pengamatan morfologi dilakukan dibawah mikroskop dengan perbesaran 400x.

4. Produksi Enzim Fitase dengan metode Solid State Fermentation

(Mandviwala dan Khire, 2000)

4.1 Masing-masing sebanyak 20 gram pollard dan bungkil kedelai ditimbang dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL sebanyak 2 perlakuan.

4.2 Perlakuan pertama tidak ditambahkan air destilasi, sedangkan perlakuan lainnya ditambahkan air destilasi sebanyak 20 mL (1:1 v/b) kemudian diautoklaf pada suhu 121°C selama 40 menit dan didinginkan.

4.3 Sebanyak 10% (b/b) isolat BAL dan khamir yang sebelumnya ditumbuhkan pada media agar diinokulasikan ke dalam erlenmeyer berisi substrat pollard dan bungkil kedelai.

4.4 Setelah diinokulasikan kemudian dicampur merata dan difermentasi pada suhu 30°C selama 48 jam untuk khamir dan suhu 37°C selama 24 jam untuk BAL.

4.5 Setelah difermentasi kemudian campuran substrat dipanen dan diekstrak enzim fitasenya.

5. Ekstraksi Enzim Fitase (Bashvar *et al.*, 2012)

5.1 Setelah proses *Solid State Fermentation* selesai, sebanyak 100 mL larutan $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2% ditambahkan ke masing-masing erlenmeyer yang mengandung 20 gram pollard atau bungkil kedelai.

5.2 Erlenmeyer ditempatkan pada *rotary shaker* pada kecepatan 200 rpm selama 2 jam untuk proses ekstraksi enzim.

5.3 Pada akhir proses ekstraksi, suspensi tersebut diperas menggunakan 2 lapis kain muslin (blacu) dan kemudian disentrifuga pada kecepatan 5000x g selama 20 menit pada suhu 4°C.

5.4 Supernatan yang jernih digunakan sebagai enzim kasar untuk pengujian tahap berikutnya.

6. Pengujian Aktivitas Fitase (Fiske dan Subbarow, 1925).

6.1 Aktivitas fitase diketahui dengan pengukuran jumlah fosfor anorganik yang dibebaskan dari sodium fitat. Campuran reaksi terdiri dari 1 mL enzim kasar, 0,5 mL buffer Na-asetat 0,1 M (pH 4), dan 0,5 mL Na-fitat 1,5 mM.

6.2 Setelah 15 menit inkubasi pada suhu 60°C reaksi dihentikan dengan menambahkan trikloroasetat (TCA) 10% sebanyak 2 mL.

6.3 Sebanyak 1 mL larutan warna segar mengandung larutan ferro sulfat : ammonium molibdat 10 mM dalam asam sulfat 5 N (1:4 v/v) ditambahkan kedalam campuran reaksi (Fiske dan Subbarow, 1925) dan diinkubasi selama 5 menit.

6.4 Blanko dibuat tanpa penambahan Na-fitat.

6.5 Fosfor (P) anorganik ditentukan dengan metode ammonium molibdat yang telah dimodifikasi dan ditera nilai absorbansinya

dengan menggunakan spektrofotometer pada $\lambda_{700\text{nm}}$ (Vohra dan Satyanaraya, 2001).

6.6 Satu unit fitase (U) didefinisikan dengan jumlah enzim yang dapat membebaskan 1 μmol P anorganik per mL per menit pada keadaan pengukuran optimal. Untuk membandingkan aktivitas diantara berbagai isolat, data dihitung dalam Unit per milligram protein (aktivitas spesifik) (Haros *et al.*, 2008).

6.7 Standar dibuat dengan cara melarutkan 0,0068 gram KH_2PO_4 kedalam 100 mL buffer Na-asetat 0,1 M pH 4. Konsentrasi induk standar yaitu 500 μM . untuk membebaskan kuantitas pembebasan fosfat, kurva kalibrasi dibuat pada konsentrasi 50-500 μM KH_2PO_4 .

7. Penentuan Protein Terlarut

7.1 Penentuan protein terlarut dilakukan menurut metode Folin-Lowry (Lowry *et al.*, 1951), menggunakan *Bovine Serum Albumine* (BSA) sebagai larutan standard dan air destilasi sebagai blanko.

7.2 Sebanyak 0,5 mL enzim kasar ditambah dengan 0,5 mL reagen Lowry B ($\text{CuSO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 1%, $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2%, NaOH 0,02 M, dan Na_2CO_3 4%), kemudian dihomogenkan dan didiamkan pada suhu kamar selama 15 menit.

7.3 Selanjutnya ditambah dengan 1,5 mL reagen Lowry A (reagen Folin Ciocalteu's Phenol 10%) dihomogenkan dan didiamkan pada suhu kamar selama 45 menit.

7.4 Setelah 45 menit warna yang terbentuk ditera nilai absorbansinya dengan spektrofotometer pada $\lambda_{700\text{nm}}$.

7.5 Larutan standar dibuat dengan cara melarutkan 0,015 gram BSA kedalam air destilasi hingga 50 mL sehingga didapatkan konsentrasi induk standar 0,3 mg/mL. blanko dibuat dengan menggunakan 0,5 mL air destilasi (tanpa sampel).

8. Purifikasi parsial enzim

Purifikasi parsial fitase dilakukan dengan metode presipitasi ammonium sulfat menurut Gunashree dan Venkateswaran (2014).

8.1 Fitase dari khamir (*Candida tropicalis* TKd3)

Supernatan (enzim kasar) dipurifikasi secara parsial menggunakan ammonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 80% (Gunashree dan Venkateswaran, 2014).

8.1.1 Enzim kasar dilarutkan dalam 1:10 (w/v) 0,1 M buffer Na-asetat (pH 4) lalu ammonium sulfat ditambahkan.

8.1.2 Larutan dibiarkan mengendap selama semalaman pada suhu dingin (4°C).

8.1.3 Presipitat (enzim purifikasi) dikoleksi dengan sentrifuga pada kecepatan 5000x g selama 30 menit.

8.1.4 Protein yang mengendap (pellet) disuspensi ke dalam 0,1 M buffer Na-asetat (pH 4) dan kemudian dianalisis menggunakan buffer yang sama semalaman.

- 8.1.5 Endapan dilarutkan 0,1 M buffer Na-asetat (pH 4), lalu diuji aktivitas enzim dan kadar protein.
- 8.1.6 Proses dialisis dilakukan dengan menempatkan suspensi enzim hasil pengendapan sebelumnya pada membran dialisis 12.000-14.000 Da lalu direndam dalam 0,1 M buffer Na-asetat (pH 4) pada suhu 4°C dengan pengaduk magnetik pada kondisi *low stirring*.
- 8.1.7 Sisa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dalam buffer diuji dengan BaCl_2 1%. Setelah tidak terbentuk endapan putih BaSO_4 , dilakukan uji kadar protein dan aktivitas fraksi enzim hasil dialisis.

8.2 Fitase dari BAL (*Lactobacillus plantarum* A1-E)

- 8.2.1 BAL ditumbuhkan dalam medium MRS *broth* termodifikasi selama 24 jam pada suhu 37°C kondisi aerob. Sel dipisahkan dengan menggunakan sentrifuga pada 4.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C (Kusumadjaja *et al.*, 2009).
- 8.2.2 Fitase dipresipitasi dari supernatan bebas sel dengan ammonium sulfat jenuh $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20 mL supernatan ditambah 8,840 g ammonium sulfat secara bertahap hingga larut, kemudian didiamkan semalaman pada suhu 4°C.
- 8.2.3 Protein dipanen menggunakan sentrifuga dengan kecepatan 4.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C.

- 8.2.4 Endapan dilarutkan dengan buffer sodium asetat-asam asetat 0,2 M pH 6, lalu diuji aktivitas enzim dan kadar protein.
- 8.2.5 Proses dialisis dilakukan dengan menempatkan suspensi enzim hasil pengendapan sebelumnya pada membran dialisis 12.000-14.000 Da dalam buffer sodium asetat-asam asetat 0,2 M pH 6 dengan pengaduk magnetik pada kondisi *low stirring*.
- 8.2.6 Sisa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dalam buffer diuji dengan BaCl_2 1%. Setelah tidak terbentuk endapan putih BaSO_4 , dilakukan uji kadar protein dan aktivitas fraksi enzim hasil dialisis.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Pengukuran Aktivitas Fitase, Kadar Protein dan Aktivitas Spesifik

Fitase (*myo-inositol hexakisfosfat fosfohidrolase*) adalah enzim yang dapat memecah senyawa fitat menjadi mio-inositol dan fosfor anorganik (asam fosfat). Fitase dari mikroba menyerang gugus fosfat pada posisi ke-3 (Susana, 2000).

Protein adalah zat makanan berupa asam-asam amino yang berfungsi sebagai pembangun dan pengatur bagi tubuh. Protein mengandung unsur karbon, hydrogen, oksigen, dan nitrogen yang tidak dimiliki oleh lemak atau karbohidrat (Budianto, 2009).

Satu unit fitase (U) didefinisikan dengan jumlah enzim yang dapat membebaskan 1 μmol P anorganik per ml per menit pada keadaan pengukuran optimal. Untuk membandingkan aktivitas diantara berbagai isolat, data dihitung dalam Unit per milligram protein (aktivitas spesifik) (Haros *et al.*, 2008).

Data hasil pengukuran aktivitas enzim *L. plantarum* A1-E pada Tabel 1.

Tabel 1 Aktivitas enzim fitase *L. plantarum* A1-E

Jenis Substrat	Aktivitas enzim (U/ml)			Rataan (U/ml)
	Supernatan	Pengendapan	Dialisis	
Pollard	0.335	7.150	6.761	4.749
SBM + air destilasi	1.891	4.761	1.428	2.693
Rataan (U/ml)	1.113	5.956	4.095	3.721

Catatan: superskrip yang berbeda pada kolom dan baris yang sama menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$). Berdasarkan Tabel 1 diketahui bahwa jenis substrat dan metode purifikasi tidak berpengaruh nyata ($p > 0,05$) terhadap aktivitas enzim. Rataan kadar aktivitas enzim pada pengujian sebesar 3,721%. Hasil penelitian ini sama dengan hasil yang diperoleh Istiqomah (2015) bahwa pemurnian parsial enzim fitase *L. plantarum* A1-E dengan menggunakan substrat Na fitat murni menghasilkan aktivitas enzim fitase yang tidak berbeda nyata dengan ekstrak kasar enzim.

Penelitian Yuanita *et al.*, (2010) menyatakan bahwa enzim fitase dari isolat *Bacillus subtilis* Holiwood Gresik mempunyai Mr 36,6 kDa. pH optimum pada kisaran 6,5-7,0, aktivitas enzim 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 enzim 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.

Data hasil pengukuran kadar protein *L. plantarum* A1-E pada Tabel 2.

Tabel 2 Kadar protein terlarut dari fitase *L. plantarum* A1-E

Jenis Substrat	Kadar protein (mg/ml)			Rataan (mg/ml)
	Supernatan	Pengendapan	Dialisis	
Pollard	53.058	31.203	41.924	42.062
SBM + air destilasi	52.875	50.974	27.721	43.857
Rataan (mg/ml)	52.967	41.089	34.823	42.960

Catatan: superskrip yang berbeda pada kolom dan baris yang sama menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$).

Berdasarkan Tabel 2 diketahui bahwa jenis substrat dan metode purifikasi tidak berpengaruh nyata ($p > 0,05$) terhadap kadar protein *L. plantarum* A1-E.

rataan kadar protein pada pengujian sebesar 42,960%. Hasil berbeda dilaporkan oleh Istiqomah (2015) bahwa metode dialisis (1,8 mg/ml), presipitasi enzim dengan ammonium sulfat (2,4 mg/ml) dapat menurunkan kadar protein terlarut dibandingkan dengan ekstrak kasar fitase *L. plantarum* A1-E dengan penggunaan substrat Na fitat murni (6,0 mg/ml).

Penelitian Suwayvia *et al.*, (2017) menyatakan bahwa penurunan konsentrasi protein bakteriosin asal *L. plantarum* FNCC 0020 terjadi setelah melalui proses dialisis, terjadi peningkatan volume setelah dialisis selesai. Hal ini menunjukkan terjadinya proses pengenceran volume bakteriosin sehingga menyebabkan menurunnya kadar protein apabila dibandingkan dengan presipitat bakteriosin. Konsentrasi protein yang dihasilkan *L. plantarum* FNCC 0020 ini adalah sebesar 352,86 µg/mL.

Data hasil pengukuran kadar aktivitas spesifik *L. plantarum* A1-E pada Tabel 3.

Tabel 3 Aktivitas spesifik fitase *L. plantarum* A1-E

Jenis Substrat	Aktivitas spesifik (U/mg)			Rataan (U/mg)
	Supernatan	Pengendapan	Dialisis	
Pollard	0.006	0.229	0.161	0.132
SBM + air destilasi	0.036	0.093	0.052	0.060
Rataan (U/mg)	0.021	0.161	0.107	0.096

Catatan: superskrip yang berbeda pada kolom dan baris yang sama menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$).

Berdasarkan Tabel 3 diketahui bahwa jenis substrat dan metode purifikasi tidak berpengaruh nyata ($p > 0,05$) terhadap kadar aktivitas spesifik *L. plantarum* A1-E. Rataan kadar aktivitas spesifik pada pengujian sebesar 0.096%. Hasil berbeda dilaporkan oleh Istiqomah (2015) bahwa aktivitas spesifik enzim fitase *L. plantarum* A1-E meningkat setelah dimurnikan

dengan metode presipitasi dengan ammonium sulfat (21,2 U/mg) dan dialisis (24,0 U/mg) dibandingkan tanpa pemurnian / ekstrak kasar fitase (4,5 U/mg).

Penelitian Novianti *et al.* (2015) menunjukkan bahwa tujuh bakteri penghasil fitase yang diisolasi dari sere dele (terasi kedelai) memiliki karakteristik Gram positif dengan sel berbentuk *coccobacilli* dan dari ketujuh isolat tersebut, isolat SDB3 memiliki aktivitas enzim tertinggi sebesar 0,00064 U/mL, mampu membebaskan 8,79 μ M fosfor organik selama 18 jam inkubasi, dan isolat SDB3 memiliki aktivitas spesifik sebesar 0,0031 U/mg.

Data hasil pengukuran kadar aktivitas enzim *Candida tropicalis* TKd3 pada Tabel 4.

Tabel 4 Aktivitas enzim fitase *C. tropicalis* TKd3

Jenis Substrat	Aktivitas enzim (U/ml)			Rataan (U/ml)
	Supernatan	Pengendapan	Dialisis	
Pollard	0.428	0.761	9.039	3.409
SBM + air destilasi	10.243	2.872	2.039	5.051
Rataan (U/ml)	5.335	1.816	5.539	4.230

Catatan: superskrip yang berbeda pada kolom dan baris yang sama menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$).

Berdasarkan Tabel 4 diketahui bahwa jenis substrat dan metode purifikasi tidak berpengaruh nyata ($p > 0,05$) terhadap kadar aktivitas enzim *Candida tropicalis* TKd3. Rataan kadar aktivitas enzim pada pengujian sebesar 4,23%.

Penelitian Fakhri *et al.*, (2016) menyatakan bahwa aktivitas fitase khamir *Ascomycota* meningkat ketika hari ke-2, yaitu ketika kurva pertumbuhan ketiga isolat menurun sebelum fase eksponensial. Hal ini menunjukkan fitase mulai aktif ketika pertumbuhan isolat terganggu, seperti penelitian Ullah dan Gibson *et al.*, (1987) yang menunjukkan *A. ficuum* aktif ketika fosfat dalam

media sudah tidak ada. Hasil menunjukkan aktivitas fitase terbesar pada *C. natalensis* dan *S. quitensis* didapatkan ketika puncak fase eksponensial, hal ini bisa disebabkan fitase dihasilkan dalam keadaan metabolisme normal isolat, sehingga semakin banyak sel yang hidup, semakin banyak fitase yang dihasilkan.

Data hasil pengukuran kadar protein enzim *Candida tropicalis* TKd3 pada Tabel 5.

Tabel 5 Kadar protein terlarut dari fitase *C. tropicalis* TKd3

Jenis Substrat	Kadar protein terlarut (mg/ml)			Rataan (mg/ml)
	Supernatan	Pengendapan	Dialisis	
Pollard	26.529	46.758	4.863	26.05
SBM + air destilasi	13.814	27.056	18.520	19.797
Rataan (mg/ml)	20.172	36.907	11.692	22.924

Catatan: superskrip yang berbeda pada kolom dan baris yang sama menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$).

Berdasarkan Tabel 5 diketahui bahwa jenis substrat dan metode purifikasi tidak berpengaruh nyata ($p > 0,05$) terhadap kadar protein enzim *Candida tropicalis* TKd3. Rataan kadar protein enzim pada pengujian sebesar 22.924%.

Penelitian Nurfahriana *et al.*, (2018) menyatakan bahwa terjadinya penurunan kadar protein terlarut pada waktu fermentasi 60 jam disebabkan substrat habis dan aktivitas mikroba tersebut menurun. Menurut Deliani *et al.*, (2008), semakin lama fermentasi berarti semakin banyak protein yang terdegradasi yang mengakibatkan protein semakin menurun.

Data hasil pengukuran kadar aktivitas spesifik enzim *Candida tropicalis* TKd3 pada Tabel 6.

Tabel 6 Aktivitas spesifik fitase *C. tropicalis* TKd3

Jenis Substrat	Aktivitas spesifik (U/mg)	Rataan
----------------	---------------------------	--------

	Supernatan	Pengendapan	Dialisis	(U/mg)
Pollard	0.016	0.016	1.859	0.630
SBM + air destilasi	0.776	0.106	0.110	0.331
Rataan (U/mg)	15.862	1.857	2.954	0.481

Catatan: superskrip yang berbeda pada kolom dan baris yang sama menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$).

Berdasarkan Tabel 6 diketahui bahwa jenis substrat dan metode purifikasi berpengaruh nyata ($p > 0,05$) terhadap kadar aktivitas spesifik enzim *Candida tropicalis* TKd3. Rataan kadar aktivitas spesifik enzim pada pengujian sebesar 0.481%.

Penelitian Widiowati *et al.*, (2001) menyatakan bahwa dalam produksi fitase dengan media PSM modifikasi sebanyak satu liter diperoleh larutan enzim kasar sebanyak 800 mL dengan aktivitas enzim 0,5683 U/mL. larutan enzim kasar tersebut mengandung protein 1,1885 mg/mL, sehingga diperoleh aktivitas spesifik 0,4782 U/mL.

Penambahan fitase secara rutin ke dalam pakan dapat dimanfaatkan untuk memecah ikatan fitat-P (Kornegay, 2001). Penggunaan fitase asal mikroorganisme dalam diet unggas telah meningkat secara nyata, penambahan fitase asal mikroorganisme yang telah mengalami rekayasa genetika dalam pakan ternak semakin banyak dilakukan. Hal tersebut terutama bertujuan untuk meningkatkan produksi dan menanggapi kekhawatiran munculnya pencemaran lingkungan fosfor asal kotoran industri peternakan unggas. Penggunaan fitase asal mikroorganisme tersebut juga mampu menekan biaya pakan dengan mengurangi komponen P yang mahal (Khan *et al.*, 2013). Fitase telah banyak diisolasi dari berbagai mikroba seperti jamur, bakteri, dan protozoa. Sebagian besar enzim ini berasal dari kelompok asam histidin

fosfatase atau dari alkalin fitase. Beberapa diantara enzim tersebut telah digunakan sebagai suplemen pakan ternak (Poliana and MacCabe, 2007).

Seperti yang dikatakan oleh Shimizu (1992) bahwa ada kendala dalam menentukan asal fitase untuk menentukan pilihan terbaik dalam kemampuannya membebaskan ikatan fosfor fitat sehingga meningkatkan pencernaan fosfor dan penyerapan mikro mineral lainnya pada sumber pakan. Hal tersebut kemungkinan disebabkan karena perbedaan kondisi percobaan dan kemurnian preparasi enzim.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan kegiatan penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Jenis substrat dan metode purifikasi tidak mempengaruhi aktivitas enzim, kadar protein terlarut, dan aktivitas spesifik enzim fitase asal mikroorganisme *L. plantarum* A1-E maupun *C. tropicalis* TKd3.
2. Produksi enzim asal mikroorganisme skala laboratorium dapat dilakukan menggunakan substrat pollard maupun bungkil kedelai (SBM) dengan metode *Solid State Fermentation*.

B. Saran

Berdasarkan hasil Praktik Kerja Lapangan (PKL) selama kurang lebih satu bulan maka beberapa saran disampaikan sebagai berikut:

1. Agar pemeliharaan, perbaikan alat dan penyimpanan bahan (reagen) di BPTBA LIPI yang digunakan untuk praktikum dioptimalkan sehingga dihasilkan data yang akurat.
2. Mahasiswa agar dapat meningkatkan kemampuan dan keterampilan diri serta memiliki tanggung jawab yang tinggi terhadap profesi. Menggunakan program PKL sebagai sarana melatih kemampuan dan kompetensi yang didapat dari mata kuliah yang sudah di tempuh dan sebagai bekal dalam menghadapi dunia kerja.

3. Perlu dilakukan kajian ulang tahap purifikasi enzim secara parsial sehingga dihasilkan data yang sesuai hipotesis yaitu metode purifikasi dapat meningkatkan aktivitas spesifik enzim.

DAFTAR PUSTAKA

- Afinah S, Yazid AM, Anis SMH dan Shuhaimi M. 2010. Review Article Phytase: application in food industry. *International Food Research Journal* 17: 13-21.
- Arief, W, R. Irawati., I.Yusmasari. 2011. Penurunan Kadar asam Fitat Tepung Jagung Selama Proses Fermentasi Menggunakan Ragi Tape. Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Lampung & Sulawesi Selatan. Universitas Lampung.
- Badan Penelitian Teknologi Bahan Alam. 2019. Online “www.bptba.lipi.go.id”. Gunungkidul. Yogyakarta.
- Beutler AL. 2009. The efficacy of Quantum TM phytase in laying hens fed corn-soybean meal based diets [Thesis]. [Saskatoon (Canada)]: University of Saskatchewan.
- Bhasvar, K., V.R. Kumarb, and J.M. Khire. 2012. Downstream Processing of Extracellular Phytase From *Aspergillus niger*. *Process Biochem.*, 47: 1066-1072.
- Budianto AK. 2009. Pangan Gizi dan Pembangunan Manusia Indonesia: Dasar-Dasar Ilmu Gizi. Malang: UMM Press 1-16.
- Deliani. 2008. Pengaruh Lama Fermentasi terhadap Kadar Protein, Lemak, Komposisi Asam Lemak dan Asam Fitat pada Pertumbuhan Tempe. Medan : Universitas Sumatera.
- El-Toukhy, Nabil M.K. Amany S. Youssef. And Mariam G. M. Mikhail. 2013. Isolation, Purification And Characterization Of Phytase From *Bacillus Subtilis* MJA. Alexandria, New Borg El-Arab: *African Journal of Biotechnology* 12 no. 20 : pp. 2957-2967.
- Fiske, C.H. and Subbarow, Y. 1925. The Colorimetric Determination of Phosphorus. *Journal of Biological Chemistry*, 66, 375-400.
- Gunashree, B.S. and Venkateswaran, G. 2014. Phytase Production by *Aspergillus niger* CFR 335 and *Aspergillus ficuum* SGA 01 through Submerged and Solid State Fermentation.
- Irianingrum, Retno. 2009. Kandungan Asam Fitat Dan Kualitas Dedak Padi Yang Disimpan Dalam Keadaan Anaerob. Skripsi. Bogor: Fakultas Peternakan Institut Petanian Bogor.

- Istiqomah, L. 2015. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Fitase dari Saluran Pencernaan Unggas serta Karakterisasi Fitasenya. Tesis. Yogyakarta : UGM.
- Khalid MF, Hussain M, Rehman AU, Shahzad MA, Sharif M, Rahman ZU. 2013. Broiler performance in response to phytase and supplemented phytase. *Iran J Appl Anim Sci.* 3:1-12.
- Khan, S.A., Chaudhry, H.R., Butt, Y.S., Jameel,T., and Ahmad,F. 2013. The Effect of Phytase Enzyme on the Performance of Broiler Flock . *Poultry Science Journal.* 1(2), 117-125.
- Kornegay, E.T. 2001. Digestion of Phosphorus and Other Nutrients : The Role of Phytase and Factors Influencing Their Activity. Department of Animal and Poultry Sciences. Virginia Polytechnic Institute and State University Blacksburg, Virginia.
- Lowry O, Rosebrough HNJ, Farr AL, & Randal RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193: 265-275.
- Mahreni, Suhenry, S. 2011. Kinetika Pertumbuhan Sel *Saccharomyces cerevisiae* dalam Media Tepung Kulit Pisang. Yogyakarta : Universitas Pembangunan Nasional “Veteran” Yogyakarta.
- Mandviwala, TN and Khire, JM. 2000. Production of High Activity Thermostable Phytase From Thermotolerant *Aspergillus niger* in Solid State Fermentation.
- Muthuraman, Meenakshi Sundaram and Avinash Tungala, K. Anantha Narayanan. 2013. Isolation Of Phytase Producing Bacteria From Poultry Faeces And Optimization Of Culture Conditions For Enhanced Phytase Production. *Academis Science: International Journal of Pharmaceutical Sciences* 5, Issue 2.
- Nurhikma. 2017. Isolasi Dan Skrining Bakteri Endofit Penghasil Fitase Dari Tanaman Jagung (*Zea mays*). Makasar: Skripsi Jurusan Biologi Fakultas Sains & Teknologi UIN Alauddin Makasar.
- Poliana, J., and MacCabe, A.P. 2007. *Industrial Enzymes; Structure Function, and Application.* Dordrecht: Springer: 505-508. ISBN 978-1-4020-5375-4.
- Ramadhan, Subagiyo, Margino S. 2012. Isolasi dan Karakteristik Bakteri Asam Laktat dari Usus udang Penghasil Bakteriosin sebagai Agen Antibakteria Pada Produk-Produk Penghasil Perikanan. *Jurnal Saaintek Perikanan.* 8(1):42-52.

- Selle PH, Ravindran V. 2007. Microbial phytase in poultry nutrition. *Anim Feed Sci Technol.* 135:1-41.
- Shimizu, M. 1992. Purification and Characterization of Phytase from *Bacillus subtilis*(natto0/n-77. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56(8), 1260-1269.
- Slominski BA, Davie T, Nyachoti MC, Jones O. 2007. Heat stability of endogenous and microbial phytase during feed pelleting. *Livest Sci.* 109:244-246.
- Susana IWR, Tangenjaya B, Hastiono S. 2000. Seleksi kapang khamir penhasil fitase. *JITV.* 5(2): 4-5.
- Ullah AH, Gibson DM. 1987. Extracellular phytase from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135: purification and characterization. *Prep Biochem Biotech.* 17(1): 63-91.
- Widiastutik, N., dan Alami, N.H. 2014. Isolasi dan Idetifikasi Yeast dari Rhizosfer *Rhizophora mucronata* Wonorejo. *J. Sains dan Seni Pomits* Vol. 3, No 1.
- Widiowati S, D Andriani, El Riyanti, P Raharto dan L Sukarno. 2001. Karakter Fitase dari *Bacillus Coagulans*. Didalam: Seminar Hasil Penelitian Ritisian dan Bioteknoogi Tanaman. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Biotekologi dan Sumerdaya Gnetik Pertanian.
- Vohra, A. & Satyanarayana, T. 2001. Phytase Production by The Yeast *Pichia anomala*. *Biotechnology Letters* 23, 551-554.

LAMPIRAN

Lampiran 1 Gambar Proses produksi enzim fitase, pemurnian parsial dan dialysis enzim



Produksi Enzim
Fitase dengan metode
Solid State
Fermentation



Proses purifikasi
parsial



Pengujian aktivitas
fitase



Enzim kasar



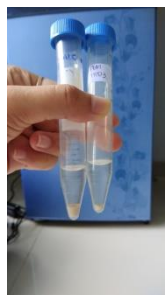
Hasil Purifikasi parsial



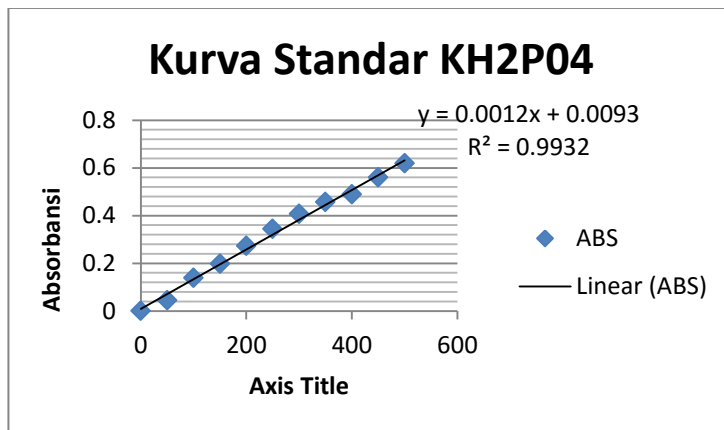
Penentuan kadar
protein terlarut



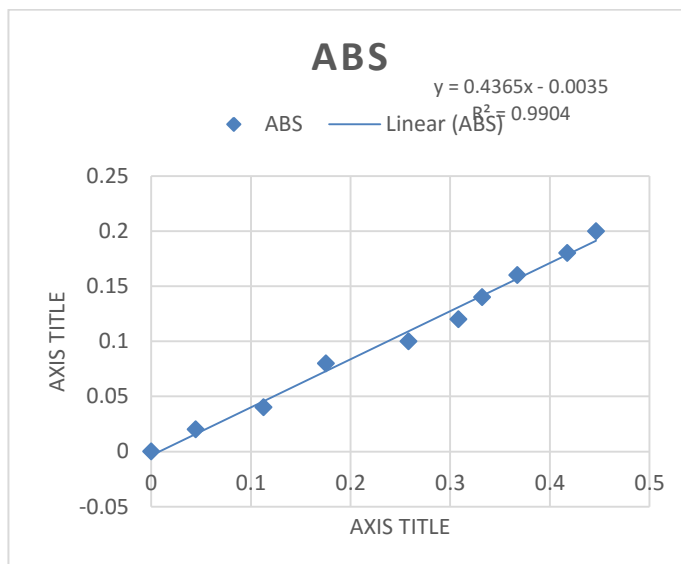
Proses dialisis



Hasil dialisis

Lampiran 2 Data Kurva Standar KH_2PO_4 

Lampiran 3 Data Kurva Standar Metode Lowry



Lampiran 4 Data Pengukuran *Lactobacillus plantarum* A1-E

1. Aktivitas enzim

Duncan^{a,b}

Metode	N	Subset		
		a	b	C
Supernatan	5	1.26860		
Dialisis	5		3.56120	
Pengendapan	5			5.71660
Sig.		1.000	1.000	1.000

2. Protein terlarut

Duncan^{a,b}

Metode	N	Subset		
		a	b	C
Dialisis	5	50.03420		
Pengendapan	5		73.64940	
Supernatan	5			84.67340
Sig.		1.000	1.000	1.000

3. Aktivitas Spesifik

Duncan^{a,b}

Metode	N	Subset		
		a	b	C
Dialisis	5	.35000		
Supernatan	5		1.07200	
Pengendapan	5			3.25400
Sig.		1.000	1.000	1.000

Lampiran 5 Data Pengujian *Candida tropicalis* TKd3

1. Aktivitas Spesifik

Duncan^{a,b}

Metode	N	Subset		
		a	b	c
Pengendapan	5	2.02760		
Dialisis	5		4.83900	
Supernatan	5			6.31660
Sig.		1.000	1.000	1.000

2. Protein terlarut

Duncan^{a,b}

Metode	N	Subset		
		a	b	c
Dialisis	5	26.11400		
Supernatan	5		37.80040	
Pengendapan	5			69.87400
Sig.		1.000	1.000	1.000

3. Aktivitas Spesifik

Duncan^{a,b}

Metode	N	Subset	
		a	b
Pengendapan	5	2.12000	
Dialisis	5	2.43000	
Supernatan	5		18.90000
Sig.		.896	1.000