

## UJI AKTIVITAS ENZIM FITASE YANG DIHASILKAN OLEH *Aspergillus niger* DAN *Neurospora* sp. PADA KONDISI FERMENTASI YANG BERBEDA

Devi Ayu Ningsih<sup>1\*)</sup>, Endang Kusdiyantini<sup>2\*)</sup>, Budi Raharjo<sup>3\*)</sup>

<sup>1</sup>Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro  
Semarang 50275 Telepon (024) 7474754; Fax. (024) 76480690  
Email: [ningsihayudevi@gmail.com](mailto:ningsihayudevi@gmail.com)

### ABSTRACT

Phytase (E.C 3.1.3.8) is an important enzyme to overcome high phytic acid in livestock feed since this enzyme has the ability to hydrolyze phytic acid contained in feed material into inositol, glucose and organic phosphorus compound. This phytase enzyme can be produced by *Aspergillus niger* and *Neurospora* sp. The purpose of this study is to obtain the condition of fermentation by *Aspergillus niger* dan *Neurospora* sp. which is optimal in the production of phytase enzyme. The treatment of fermentation condition includes different pH, temperature and addition of C source (glucose). The production of enzyme was carried out in media containing glucose KCl, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaOH with the addition of Palm Oil Mill Effluent. Mold was grown in liquid medium and measured the activity of phytase enzyme using spectrophotometry. This study used a Complete Randomized Design factorial pattern with two factors. The first assaying ANOVA used a variation in the concentration of Palm Oil Mill Effluent with pH while, the second assaying used a variation in the concentration of Palm Oil Mill Effluent with temperature, and third assaying used a variation of glucose concentration with incubation times. Each factor was repeated 3 times. The data obtained were then analyzed using Analysis of Variance (ANOVA). The result of observation showed optimal phytase enzyme activity for *A. Niger* at pH 5 on the temperature of 35°C as much as 0.241 and 0.258 U U/ml while *Neurospora* sp. at pH 6 on the temperature of 35°C as much as 0,273 and 0,253 U/ml. The addition of glucose experienced optimal phytase activity for *Aspergillus niger* as much as 0,099 U/ml at incubation time in 96 hours and *Neurospora* sp. as much as 0,152 U/ml in 48 hours will then decrease at subsequent incubation time.

*Keywords: phytase, Palm Oil Mill Effluent, pH, A. niger and Neurospora sp.*

### ABSTRAK

Fitase (E.C 3.1.3.8) merupakan enzim yang penting untuk mengatasi tingginya asam fitat dalam pakan ternak, karena enzim ini mempunyai kemampuan menghidrolisa asam fitat yang terkandung pada bahan pakan menjadi senyawa inositol dan glukosa serta senyawa fosfor organik. Enzim fitase ini dapat diproduksi oleh *Aspergillus niger* dan *Neurospora* sp. Tujuan penelitian ini adalah memperoleh kondisi fermentasi oleh *Aspergillus niger* dan *Neurospora* sp. yang optimal pada produksi enzim fitase. Perlakuan kondisi fermentasi meliputi pH, suhu yang berbeda dan penambahan sumber C (glukosa). Produksi enzim dilakukan dalam media yang mengandung glukosa, KCl, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaOH dengan penambahan limbah kelapa sawit. Kapang ditumbuhkan pada media cair dan diukur aktivitas enzim fitase menggunakan spektrofotometri. Penelitian ini menggunakan rancangan faktorial dalam Rancangan Acak lengkap (RAL). Pengujian ANOVA yang pertama yaitu menggunakan variasi konsentrasi limbah kelapa sawit dengan pH, pengujian kedua menggunakan variasi konsentrasi limbah kelapa sawit dengan suhu dan pengujian ketiga menggunakan variasi konsentrasi glukosa dengan waktu inkubasi. Masing-masing faktor dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan *Analysis Of Variance* (ANOVA). Hasil penelitian aktivitas enzim yang optimal untuk *A. niger* pada pH 5 di suhu

35<sup>0</sup>C sebesar 0,241 dan 0,258 U/ml, sedangkan *Neurospora* sp. pada pH 6 di suhu 35<sup>0</sup>C sebesar 0,273 dan 0,253 U/ml. Penambahan glukosa mengalami aktivitas fitase optimal untuk *Aspergillus niger* sebesar 0,099 U/ml pada waktu inkubasi 96 jam dan *Neurospora* sp. sebesar 0,152 U/ml pada 48 jam kemudian akan menurun pada waktu inkubasi selanjutnya.

*Kata kunci: Fitase, Limbah kelapa sawit, pH, A.niger dan Neurospora sp.*

## PENDAHULUAN

Fitase (EC 3.1.3.8) merupakan salah satu enzim yang tergolong dalam kelompok enzim fosfatase yang mampu menghidrolisis senyawa fitat (Lamid, 2014). Asam fitat (asam mio-inositol heksa fosfat) dan turunannya adalah senyawa fosfor organik yang banyak terdapat didalam biji-bijian dan sereal. Senyawa fitat merupakan bentuk penyimpanan utama fosfor (P) yang biasa terdapat pada pakan dan dapat mencapai 80% dari total fosfor yang ada. Senyawa fitat bersifat anti nutrisi dan mudah berikatan dengan protein dan mineral-mineral seperti: Zn, Ca, Mg, dan Fe sehingga tidak terjadi metabolisme secara sempurna dalam saluran pencernaan hewan, khususnya hewan ternak monogastrik (Greiner and Konietzny, 2011). Asam fitat yang tidak mengalami metabolisme menimbulkan beberapa masalah yaitu menghambat daya cerna protein maupun ketersediaan biologis beberapa mineral yang penting, menimbulkan polusi lingkungan, dan menyebabkan kenaikan biaya produksi pakan ternak (Lott *et al.*, 2000). Kapang yang banyak menghasilkan enzim fitase akan banyak menghasilkan enzim fitase pada kondisi pH 2,5-5,0 namun produksi fitase akan terhambat jika media mengandung fosfat > 20 mg/L (Gargova *et al.*, 1997).

Fitase diproduksi dari mikroorganisme yang sudah diteliti oleh ahli antara lain: *Aspergillus niger* dan *Neurospora* sp. merupakan kapang yang berpotensi menghasilkan fitase. Kapang yang sering digunakan dalam teknologi fermentasi dan membantu proses enzim fitase antara lain *Aspergillus niger*. *A. Niger* merupakan salah satu jenis *A.niger* yang tidak menghasilkan mikotoksin sehingga tidak membahayakan (Gray, 1970). Menurut Shieh dan Ware (1968) aktivitas fitase ekstraseluler yang

tinggi ditemukan pada *A. niger* dan *Aspergillus ficuum*.

Optimasi faktor lingkungan dilakukan untuk mengurangi biaya produksi, penggunaan bahan baku, memaksimalkan hasil produksi maupun efisiensi dari proses produksi yang dilakukan (Biorata, 2012). Gull *et al.*, (2013) melakukan penelitian mengenai optimasi suhu pada berbagai kapang dengan rentang suhu antara 20 40<sup>0</sup>C. Hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan bahwa kapang mampu memproduksi fitase secara maksimal pada suhu 28 35<sup>0</sup>C. Kapang yang digunakan saat penelitian ini adalah *A. niger* dan *Neurospora* sp. Hal ini menunjukkan kapang mampu memproduksi fitase secara maksimal pada pH, suhu, dan sumber dari C pertumbuhan optimalnya. Penelitian ini digunakan untuk menentukan optimasi kondisi fermentasi, dan mengukur aktivitas enzim fitase pada kapang *A. niger* dan *Neurospora* sp.

## METODE PENELITIAN

Penelitian dilalukan di Laboratorium Mikrobiologi Lingkungan, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Cibinong. Waktu pelaksanaan penelitian adalah Maret-Mei 2017. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: limbah cair kelapa sawit yang diperoleh dari laboratorium mikrobiologi LIPI, Glukosa, MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O, KCl, FeSO<sub>4</sub>, NaOH, medium seleksi, Potato Dextose Agar (PDA), asam Fitat, amonium molibdat, asam askorbat, asam sulfat, natrium karbonat, tisu, alkohol 70%, dan aquades.

**Pembuatan Standar Fosfat.** Pembuatan standar fosfat dilakukan dengan membuat larutan stok PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> 1000 ppm. Larutan stok dibuat dengan cara KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> sebanyak 0,1432 gram ditimbang dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi 100 mL akuades.

Larutan  $\text{PO}_4^{3-}$  1000 ppm kemudian diencerkan hingga konsentrasinya menjadi 100, 200, 300, 400, 500 ppm. Sebanyak 50  $\mu\text{L}$  masing-masing konsentrasi tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan 50  $\mu\text{L}$  Na-fitat dan diinkubasi selama 30 menit. Setelah diinkubasi, larutan kemudian ditambahkan dengan 160  $\mu\text{L}$  reagen campuran dan didiamkan selama tiga jam hingga terbentuk warna biru. Selanjutnya, larutan-larutan tersebut diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang ( ) 880 nm. Absorbansi yang didapat kemudian dibuat persamaan linear.

**Pembuatan mix reagen.** *Mix reagen* dibuat dengan menggunakan HCl 5N, Kalium Antimonyl, Ammonium Molibdat, Asam askorbat 0,1 M. Cara pembuatan reagen adalah HCl 5N (35 ml HCl + 150 ml aquades sebanyak 50 ml), Kalium Antimonyl (1,3715 gram dalam 400 ml aquades sebanyak 5ml), Ammonium Molibdat (20 gram dalam 500 ml aquades sebanyak 15 ml) dan Asam Askorbat 0,1 M ( 1,7 gr dalam 100 ml aquades sebanyak 30 ml). Cara membuat mix reagen adalah dengan mencampurkan semua larutan yang sudah dipersiapkan.

**Pembuatan Inokulum** *A. niger* dan *Neurospora* sp. ditumbuhkan pada media cair Potato Dextrose Agar (PDA) yang sudah disiapkan dan diinkubasi selama 120 jam pada suhu 30°C. Kapang yang sudah tumbuh kemudian dimasukkan 5 ml aquades kedalam tabung reaksi dan digunakan untuk inokulum fermentasi.

**Fermentasi Cair.** Sebanyak 4 ml limbah kelapa sawit dan 600 ml yang berisi larutan garam seperti  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  18 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; KCl, 0,3 g;  $\text{FeSO}_4$ , 0,06 g; NaOH, 5,16 g, dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer. Erlenmeyer yang berisi larutan dan limbah cair kelapa sawit dihomogenkan dan disterilisasi selama 20 menit pada suhu 121°C tekanan 1 atm. Media cair dikeluarkan dan dibiarkan selama 24 jam, pada suhu 28°C. Kapang yang sudah dimurnikan, dimasukkan kedalam larutan.

#### **Optimasi Kondisi Fermentasi**

**pH.** Tabung erlenmeyer berisi 4,2 g PDA, dalam 100 ml aquades. Larutan digojok sampai homogen, lalu dimasukkan 1 ml limbah kelapa sawit. pH yang diukur adalah 5-7 dengan menggunakan alat pH meter. Larutan disterilisasi selama 20 menit pada suhu 121°C tekanan 1 atm, kemudian dituang ke dalam cawan petri. Media yang sudah beku, diinokulasi dengan jamur *A. niger* dan *Neurospora* sp. Inkubasi dilakukan selama 72 jam. *A. niger* dan *Neurospora* sp. di ukur dengan menggunakan jangka sorong, untuk mengukur diameter koloni.

**Konsentrasi Substrat limbah cair 1%.** Media cair yang sudah dibuat dimasukkan 1% limbah cair kelapa sawit kedalam tabung erlenmeyer. Media cair yang sudah dimasukkan limbah sawit, kemudian dibagi menjadi beberapa tabung erlenmeyer sesuai dengan pH optimal *A. niger*, *Neurospora* sp. dan masing-masing kontrol. Tabung yang sudah dipisah sesuai dengan pH, kemudian sterilisasi selama 20 menit pada suhu 121°C tekanan 1 atm menggunakan autoklaf. Media dan limbah cair kelapa sawit didiamkan pada suhu 30°C, lalu *A. niger* dan *Neurospora* sp. kedalam tabung erlenmeyer. Pengukuran aktivitas enzim selanjutnya dilakukan pada masing- masing perlakuan.

**Suhu.** Penambahan limbah kelapa sawit 1% didalam media cair, kemudian diinkubasi pada suhu 28°C dan 35°C untuk mencari suhu optimal. Pengukuran aktivitas enzim fitase selanjutnya dilakukan pada masing-masing perlakuan suhu.

**Sumber C (Glukosa).** *A. niger* dan *Neurospora* sp. dengan aktivitas fitase tertinggi diinokulasi ke dalam 400 ml media. Optimasi sumber C dilakukan dengan menggunakan sumber karbon glukosa 1%. Optimasi sumber karbon diukur dengan mengukur aktivitas enzim fitase pada kapang *A. niger* dan *Neurospora* sp. dalam media cair. Perlakuan media kontrol dibuat tanpa penambahan sumber karbon.

**Pengukuran Aktivitas Enzim Fitase.** *A. niger* dan *Neurospora* sp. yang dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer yang berisi media cair sebanyak 50 mL. Media cair berisi inokulan kemudian

diinkubasi pada *rotary shaker* dengan kecepatan 200 rpm pada suhu 28°C dan 35°C selama 6 hari di dalam inkubator. Pengukuran aktivitas fitase dilakukan dengan mengambil sampel sebanyak 2 mL pada inkubasi 120 jam, sedangkan penambahan glukosa setiap inkubasi 48 jam; 96 jam; 144 dan disentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan hasil sentrifugasi diambil sebanyak 50 µL dan dipanaskan dalam penangas air pada suhu 100°C selama 10 menit. Sampel kemudian ditambahkan dengan Na-Fitat 0.5% dalam buffer Na-asetat (0.1 M, pH 5.4) sebanyak 50 µL dan diinkubasi selama 30 menit. Reaksi substrat-fitase kemudian dihentikan dengan pemanasan pada suhu 100°C selama 10 menit. Selanjutnya mix reagen ditambahkan sebanyak 160 µL dan didiamkan selama 3 jam hingga terbentuk warna biru. Sampel diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 880 nm. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan memplotkan absorbansi sampel dengan persamaan garis pada kurva standar fosfat. Aktivitas enzim dinyatakan dalam Unit/mL. Satu unit enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang membebaskan 1 µmol fosfat anorganik dalam satu menit per milliliter enzim. Menurut Suresh dan Radha (2015) perhitungan aktivitas enzim dapat dihitung dengan cara:

Aktifitas fitase

$$\frac{\text{unit}}{\text{mL}} = \frac{[\text{Fosfat}] \left( \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) \times \text{Volume total } (\mu\text{L}) \times \text{faktor pengenceran}}{\text{BM PO}_4 \times \text{Volume enzim } (\mu\text{L}) \times \text{waktu inkubasi (jam)}}$$

Keterangan: v : Volume Fitase (U/ml)  
t : Waktu Inkubasi (0,5 jam)  
BM PO<sub>4</sub>: Berat Molekul PO<sub>4</sub> (95 gr/mol)  
Fp : Faktor Pengenceran (1)

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Pertumbuhan *A.niger* dan *Neurospora sp.*

Kapang *A. niger* dan *Neurospora sp.* merupakan kapang yang dapat menghasilkan produksi enzim fitase. Fitase dapat digunakan untuk mendegradasi asam fitat pada hewan monogastrik, karena hewan tersebut tidak dapat mendegradasi asam fitat. Penelitian ini melakukan pertumbuhan kapang *A. niger* dan *Neurospora sp.* pada media PDA dengan penambahan POME. Media tersebut digunakan untuk pertumbuhan kapang yang ditandai dengan diameter koloni. Menurut Fardiaz (1992) bahwa pertumbuhan diameter koloni dengan pertumbuhan miselium semakin membesar serta terbentuknya spora (sporulasi) yang semakin lebat. *A.niger* dapat tumbuh cepat dengan menggunakan nutrisi yang ada disekelilingnya. Pada umumnya suatu koloni berasal dari satu sel yang semula tidak terlihat menjadi terlihat yaitu dari spora atau konidia kapang menjadi miselium atau koloni. Pertumbuhan kapang *A. niger* dan *Neurospora sp* pada media PDA tersebut ditunjukkan pada (Tabel 4.1)

Tabel 4.1 Pertumbuhan diameter koloni kapang *A. niger* dan *Neurospora sp* pada waktu inkubasi 120 jam di media PDA.

| Kapang                | Diameter koloni (cm) |      |      |
|-----------------------|----------------------|------|------|
|                       | pH 5                 | pH 6 | pH 7 |
| <i>A. niger</i>       | 4                    | 2,9  | 3,7  |
| <i>Neurospora sp.</i> | 3,8                  | 4    | 3,5  |

Berdasarkan Tabel 4.1 memperlihatkan adanya pertumbuhan koloni kapang, ditandai dengan pertumbuhan diameter *A.niger* dan *Neurospora sp.* semakin lama waktu inkubasi, maka semakin besar diameter koloni. Kapang *A. niger* pada pH 5,6 dan 7 didapat diameter koloni 4 cm; 2,9 cm; dan 3,7 cm. *Neurospora sp.* 3,8 cm; 4 cm; dan 3,5 cm. Hasil penelitian yang didapat kapang *A. niger* di media PDA memiliki pertumbuhan baik pada pH 5 dan pH 7 dengan diameter 4 cm dan 3,7 cm, sedangkan kapang *Neurospora sp.* pH 5 dan pH 6 dengan diameter 3,8 cm; dan 4 cm. Kapang *A. niger* dapat tumbuh pada rentang pH 5 sampai 7. Sesuai dengan pernyataan Acharya *et al.*, (

2008) bahwa pH ini berada dalam rentang pH pertumbuhan *A. niger* antara pH 4 dan 4,5.

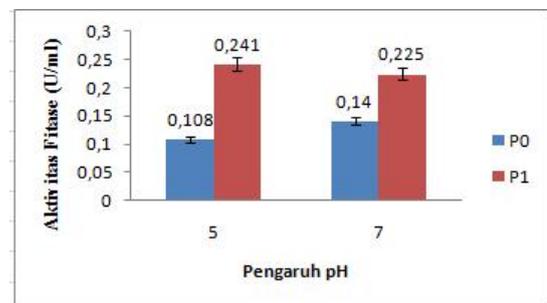
### Aktivitas Enzim Fitase pada pH Media Yang Berbeda

Kapang *A. niger* dan *Neurospora* sp. ditumbuhkan pada media cair. Penelitian ini dimaksudkan untuk menentukan pH optimal produksi fitase. Tinggi rendahnya pH dapat mempengaruhi pertumbuhan suatu mikroba, bahkan di pH tertentu, mikroba tidak dapat tumbuh (Santos, 2011). Optimasi produksi fitase dengan parameter pH fermentasi dilakukan pada hari kelima untuk *A. niger* dan *Neurospora* sp. Nilai pH fermentasi yang digunakan adalah pH 5, dan 7 untuk *A. Niger* sedangkan *Neurospora* sp. pH 5 dan 6. Kapang *A. niger*, dan *Neurospora* sp. memiliki aktivitas optimal pada pH yang berbeda.

Hasil penelitian pada kapang *A.niger* menunjukkan aktivitas enzim fitase paling tinggi yaitu 0,241 U/mL terdapat pada perlakuan penambahan POME 1% dengan pH 5 dan aktivitas enzim fitase paling tinggi untuk perlakuan POME 0% yaitu 0,14 U/mL dengan pH 7 (Gambar 4.2). Perlakuan POME 1% mempunyai aktivitas paling tinggi dengan pH 5 yang disebabkan oleh adanya penambahan POME sebagai sumber fosfor, kalsium, dan magnesium untuk kebutuhan pertumbuhan kapang *A. niger* bila dibandingkan dengan perlakuan POME 0%. Hasil ini sama dengan hasil penelitian yang dilakukan Gargova *et al.*, (1997) bahwa salah satu kapang yang banyak menghasilkan enzim fitase pada kondisi pH 2,5-5,0, namun produksi fitase akan terhambat jika media mengandung fosfat > 20 mg/L.

Kapang *Neurospora* sp. memiliki pH 5 dan 6. pH 5 memiliki aktivitas 0,211 U/ml sedangkan pada pH 6 aktivitas enzim sebanyak 0,296 U/ml. Hasil penelitian diperoleh berdasarkan (Gambar 4.3) bahwa pH 6 untuk *Neurospora* sp. paling optimal. Media cair untuk faktor pH tersebut berpengaruh terhadap pertumbuhan biomassa dan produksi enzim fitase. Sesuai dengan (Han *et al.*, 1987; Ramachandran *et al.*, 2005)

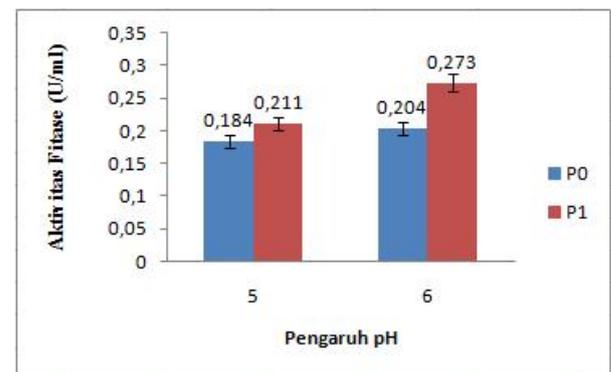
bahwa *Neurospora* menghasilkan enzim fitase optimal pada pH 6,8 -7,0.



Gambar 4.2. Pengaruh pH terhadap aktivitas fitase *A.niger* dengan penambahan limbah kelapa sawit 1%

Keterangan:

- P<sub>0</sub> : 0% POME
- P<sub>1</sub> : 1% POME



Gambar 4.3. Pengaruh pH terhadap aktivitas fitase *Neurospora* sp. dengan penambahan limbah kelapa sawit 1%

Keterangan:

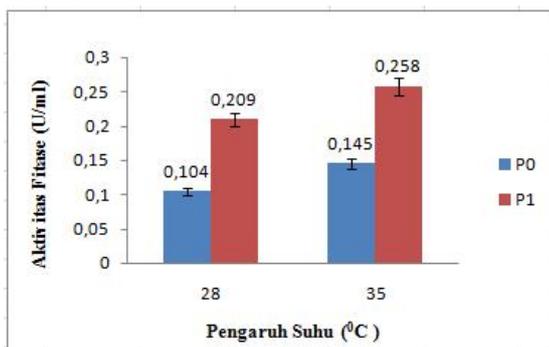
- P<sub>0</sub> : 0% POME
- P<sub>1</sub> : 1% POME

Berdasarkan Gambar 4.2 dan Gambar 4.3 menunjukkan bahwa pH memiliki keasaman pada kapang *A. niger* dan *Neurospora* sp. sehingga kapang tersebut mampu menghasilkan fitase yang tinggi. Kondisi pH yang asam mempermudah pelepasan enzim fitase, sedangkan kondisi pH yang tinggi atau basa menyebabkan pelepasan enzim fitase ke luar sel akan terhambat. Pada akhir hidrolisis, pH mengalami perubahan menjadi pH 5 untuk *A.niger* dan *Neurospora* sp. di pH 6. Kondisi pH 4-5 merupakan pH yang optimal untuk menghasilkan

pertumbuhan *Aspergillus* sp. sehingga kapang dapat melakukan aktivitas enzim yang maksimal (Gunam *et al.*; 2010). Penelitian Widyastuti (2008), dijelaskan bahwa secara umum kapang dapat tumbuh dan menghasilkan berbagai macam enzim pada kisaran pH asam. Sampai pada kecepatan suatu reaksi enzimatis meningkat sejalan dengan meningkatnya pH. Menurut Campbell *et al.*, (2002), nilai pH optimal untuk bekerja paling aktif pada kapang *Aspergillus* sp. sekitar 5 sampai 8. Aktivitas enzim dipengaruhi oleh pH karena sifat ionik gugus karboksil dan gugus amino yang mudah dipengaruhi pH. Kapang *A. niger* dan *Neurospora* sp. dapat menghasilkan enzim fitase, sama halnya bahwa bakteri *Lactobacillus casei* juga dapat menghasilkan aktivitas fitase maksimal diperoleh pada pH 5.0 dan suhu optimum fitase adalah di 25°C-40°C (Zuo R *et al.*, 2010).

#### Pengaruh Suhu Inkubasi terhadap Aktivitas Enzim Fitase yang diproduksi oleh *A. niger*, dan *Neurospora* sp.

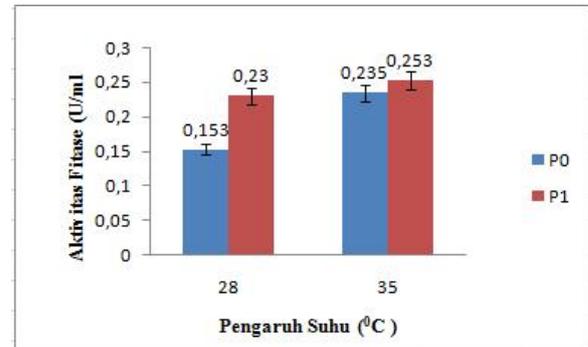
Pengaruh suhu inkubasi terhadap aktivitas fitase yang diproduksi oleh kapang *A. niger*, dan *Neurospora* sp. diamati pada suhu 28°C dan 35°C. Perlakuan suhu inkubasi dilakukan pada media terbaik yang didapat dari pengamatan perlakuan media cair. Pengaruh suhu inkubasi terhadap produksi fitase dilihat berdasarkan besarnya nilai aktivitas enzim yang dihasilkan oleh setiap kapang *A. niger* dan *Neurospora* sp. pada media cair dapat dilihat pada Gambar 4.3. dan Gambar 4.4.



Gambar 4.4 Aktivitas fitase yang diproduksi oleh *A. niger*, pada media dengan suhu 28°C dan 35°C

Keterangan:

- P<sub>0</sub> : 0% POME
- P<sub>1</sub> : 1% POME



Gambar 4.5 Aktivitas fitase yang diproduksi oleh *Neurospora* sp. pada media dengan suhu 28°C dan 35°C

Keterangan:

- P<sub>0</sub> : 0% POME
- P<sub>1</sub> : 1% POME

Berdasarkan Gambar 4.4 dan Gambar 4.5 dapat diketahui bahwa suhu mempengaruhi fitase yang diproduksi oleh kedua kapang. Kapang *A. niger* dapat memproduksi fitase dengan nilai unit aktivitas sebesar 0,209 U/ml pada suhu 28°C. Suhu lingkungan yang optimal mengakibatkan organisme tumbuh baik sehingga produksi enzim menjadi baik pula. Penelitian ini menunjukkan bahwa kapang *A. niger* masih mampu memproduksi fitase pada saat suhu dinaikkan hingga 35°C dan memiliki nilai aktivitas yang optimal, namun diduga kapang ini masih mampu memproduksi fitase saat suhu lebih tinggi dari 35°C, hal ini karena pada rentang 25-37°C fitase dari *A. niger* belum menunjukkan penurunan aktivitas. Penelitian Hu *et al.*, (2011) menunjukkan *A. niger* dan *A. oryzae* mampu memproduksi protein lebih tinggi pada suhu inkubasi 35°C dibandingkan dengan suhu inkubasi 28°C. Pendapat lain pun menyebutkan bahwa fitase cenderung stabil pada suhu 30-70°C (Moreira *et al.*, 2014).

Kapang *Neurospora* sp. (Gambar 4.5) mampu mencapai nilai aktivitas enzim tertinggi pada suhu 35°C dengan unit aktivitas

sebesar 0,253 U/ml. Hal ini sejalan dengan pernyataan Steinkraus, dkk. (1965), bahwa *Neurospora* sp. termasuk jamur mesofilik yang memiliki suhu optimum pertumbuhan sekitar 30-35°C. *Neurospora* sp. mengalami kenaikan aktivitas enzim saat suhu inkubasi dinaikkan dari 28°C menjadi 35°C, kemudian aktivitas mulai nampak saat suhu inkubasi dinaikkan diatas 35°C dan akan mengalami penurunan diatas 35°C. Penurunan aktivitas fitase ini dapat terjadi karena *Neurospora* sp tidak dapat tumbuh dengan baik pada suhu inkubasi diatas 35°C, sehingga sel mengalami kematian yang mengakibatkan produksi enzim menurun. Pada suatu reaksi enzimatik, suhu mempengaruhi kestabilan enzim. Kenaikan suhu sedikit di atas suhu optimum dapat menyebabkan penurunan aktivitas enzim, sedangkan pada suhu jauh di atas suhu optimum enzim akan mengalami denaturasi hingga kehilangan aktivitas katalitiknya (Shuler dan Kargi, 2002).

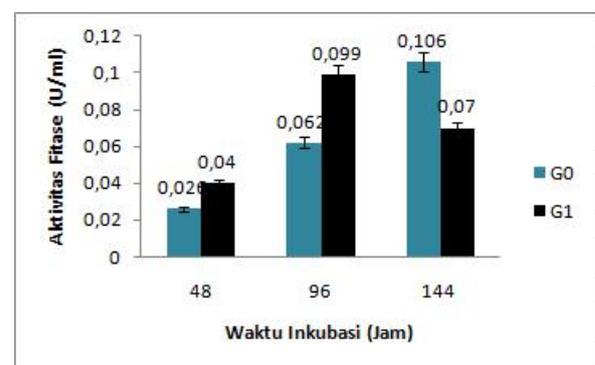
#### Pengaruh Penambahan Sumber C (Glukosa)

Glukosa telah banyak dimanfaatkan untuk produksi fitase, salah satunya pada kapang dengan teknik *submerged fermentation* oleh Martin *et al.*, (2003) yang melakukan penelitian terhadap *Aspergillus awamori*. Glukosa juga adalah jenis sumber karbon yang paling sederhana dalam metabolisme karbon sehingga lebih mudah dikonversi menjadi energi dibandingkan sumber karbon yang lain (Murray *et al.*, 2012). Kapang *A. niger* dan *Neurospora* sp. memiliki perbandingan waktu inkubasi yang berbeda pada kedua kapang tersebut. Dilihat dari aktivitas fitase *A. niger* dan *Neurospora* sp. dari Gambar 4.6. dan Gambar 4.7.

Kapang *A. niger* pada Gambar 4.6 mengukur aktivitas fitase selama inkubasi 48 jam yaitu 0,04 U/ml, pada waktu inkubasi 96 jam terjadi kenaikan yang signifikan sebanyak 0,099 U/ml dan terjadi penurunan pada jam ke-144 sebanyak 0,07 U/ml. Hasil penelitian fitase meningkat sesuai dengan pertambahan waktu inkubasi dan mencapai produk enzim maksimum pada jam ke-96 inkubasi pada

kapang *A.niger* diperoleh hasil sebanyak 0,099 U/ml. Sesuai dengan Nair *et al.*, (1991) dan Ebune *et al.*, (1995), yang menemukan bahwa produksi enzim fitase oleh *A. ficuum* dihambat oleh konsentrasi glukosa yang tinggi dan akan mengalami penurunan saat titik optimal. Konieczny Greiner (2004), menyatakan bahwa sintesis fitase dari *A. niger* adalah pada fase awal lag dan mencapai puncak produksi stasioner dan turun dititik kematian.

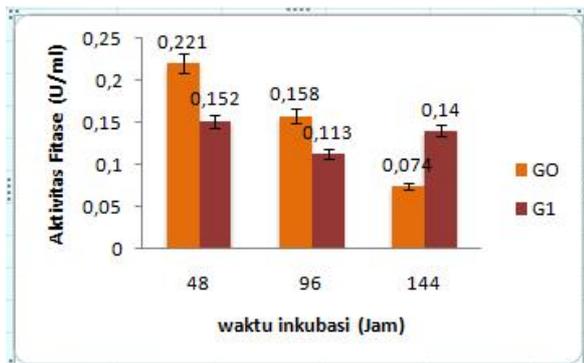
Kapang *Neurospora* sp. pada gambar 4.7 mengukur aktivitas fitase selama inkubasi 48 jam yaitu 0,221 U/ml, pada waktu inkubasi 96 jam terjadi penurunan yang signifikan sebanyak 0,113 U/ml dan terjadi kenaikan pada jam ke-144 sebanyak 0,140 U/ml. Hasil penelitian menunjukkan bahwa waktu inkubasi 48 jam yang mendapatkan fitase yang optimal, karena *Neurospora* sp. Dapat menghidrolisis glukosa dengan cepat di fase lag (fase adaptasi). Hal tersebut sesuai dengan pendapat Brock and Madigan (1991), bahwa glukosa sebagai sumber karbon mempunyai peran ganda, baik dalam biosintesis maupun pembentukan energi bagi sel kapang. Kadar glukosa dalam media dapat meningkatkan kecepatan tumbuh spesifik, namun dalam batas tertentu peningkatan kadar glukosa akan menurunkan kecepatan tumbuh spesifik sel kapang (Griffin, 1999)



Gambar 4.6 Aktivitas Fitase yang diproduksi oleh *A. niger* pada Media Penambahan Glukosa.

Keterangan:

- G<sub>0</sub> : 0% Glukosa
- G<sub>1</sub> : 1% Glukosa



Gambar 4.7 Aktivitas Fitase yang diproduksi oleh *Neurospora* sp. pada Media Penambahan Glukosa

Keterangan:

- G<sub>0</sub> : 0% Glukosa
- G<sub>1</sub> : 1% Glukosa

## SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat diambil kesimpulan bahwa terdapat pengaruh perlakuan terhadap hasil aktivitas enzim fitase pada pH dan suhu oleh *A.niger* dan *Neurospora* sp. sedangkan tidak terdapat pengaruh pada penambahan glukosa. Hasil penelitian aktivitas enzim yang optimal untuk *A. niger* pada pH 5 di suhu 35<sup>0</sup>C sebesar 0,241 dan 0,258 U/ml, sedangkan *Neurospora* sp. pada pH 6 di suhu 35<sup>0</sup>C sebesar 0,273 dan 0,253 U/ml. Penambahan glukosa mengalami aktivitas fitase optimal untuk *Aspergillus niger* sebesar 0,099 U/ml pada waktu inkubasi 96 jam dan *Neurospora* sp. sebesar 0,152 U/ml pada 48 jam kemudian akan menurun pada waktu inkubasi selanjutnya.

## Daftar Pustaka

Arief, Ratna Wylis., Irma, Irawati., Yusmasari. 2011. *Penurunan Kadar Asam Fitat Tepung Jagung selama Proses Fermentasi Menggunakan Ragi Tempe*. Seminar Nasional Serelia.

Barrientos, L., Scott, J. J. and Murty, P. P. (1994) Specificity of Hydrolysis of Phytic Acid by Alkaline Phytase from Lily Pollen. *Plant Physiol.* 106: 1489 – 1495.

Banerjee, Vats P. UC. 2004. Production Studies and Catalytic Properties of Fitases (Myoinositolhexakisphosphate Phosphohydrolases): an overview. *Enzyme Microba Technology.* 35: 3–14.

Biorata, A. M. 2012. Optimasi Produksi Selulase dari *Bacillus* sp. BPPT CC RK 2 Menggunakan Metode Respon Permukaan dengan Variasi Rasio C/N dan pada Waktu Fermentasi. *Skripsi*. Fakultas Teknik Universitas Indonesia. Depok.

Bhavsar, Kavita., P. Buddhiwant., S. K. Soni., D., Depan., S. Sarkar., dan J. M., Khire. 2013. Fitase Isozymes from *Aspergillus niger* NCIM 563 Under Solid State Fermentation: Biochemical Characterization and Their Correlation with Submerged Fitases. *Process Biochemistry.* 48: 1618-1625.

Boer, I. S., Adelina., dan N. A. Pamukas. 2014. Pemanfaatan Fermentasi Ampas Tahu dalam Pakan Ikan untuk Pertumbuhan Ikan Gurame *Oshpronemus gouramy* Lac. *Prosiding Seminar Antarbangsa ke-2 Ekologi, Habitat Manusia dan Perubahan Persekitaran*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Riau.

Brock, T. D., M. T. dan J. M. Madigan. 1991. *Biology of Microorganism.* 6<sup>th</sup> Edition. Prentice-Hall International, Inc., New Jersey.

Campbell, N. A., J. B Reece, and L. G. Mitchell. 2002. *Biologi Edisi Kelima Jilid 1*. Erlangga, Jakarta.

Cheryan, M (1980) Phytic Acid Interaction in Food Systems. *CRC crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 13: 297-335.

Conrad, B., Savchenko, R.S., Breves, R. and Hofeweister, J. (1996) A T7 Promoterspecific, Inducible Protein Expression System for *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen.Genet.* 250: 230-236.

- Cosgrove, D.J. 1980. *Inositol phosphates: Their Chemistry, Biochemistry, and Physiology*. Elsevier Scientific Publishing Company, New York.
- Davies, N. T. Vahoung, G. V. and Kritchevsky, D., Eds., 1982. *Effects of Phytic Acid on Mineral Availability in Dietary Fiber in Health and Disease*. Plenum Press, New York.
- Falony, G., J. C. Armas, J. C. D. Mendoza dan J. L. M. Hernández. 2006. Production of Extracellular Lipase from *Aspergillus niger* by Solid-State Fermentation. *Food Technol. Biotechnol.* 44 (2): 235–240.
- Fardiaz, S. (1992). *Mikrobiologi Pangan 1*. PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Finkelstein, D.B., et al. 1989. *Protein secretion in Aspergillus niger*. In C.L. Hershberger, S. Queener, and G. Hegeman, (eds), *Genetics and Molecular Biology of Industrial Microorganisms*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Francis, F., A. Sabu, K. M. Nampoothiri, S. Ramachandran, S. Ghosh, G. Szakacs, and A. Pandey. 2003. Use of Response Surface Methodology for Optimizing Process Parameters for The Production of Alpha-amylase by *Aspergillus oryzae*. *Biochem. Engin. J.* 15: 107- 115.
- Garbutt J. 1997. *Essentials of Food Microbiology*. Arnold, London.
- Gargova, S., Z. Roshkova, and G. Vancheva. 1997. Screening of Fungi for Phytase Production. *Biotechnology.* 11: 221–224.
- Gilbert, D., Gil, Brum., Larry, McKane., John, Wiley., and Gerry, Karp. 1994. *Biology: Exploring Life*. New York .
- Gray, W. D. 1970. *The Use of Fungi as Food and in Food Processing*. Ohio, CRC Press.
- Greiner, R., H. E., Konietzn dan K. D. Jany. 1997. Purification and Characterization of Fitase from *Klebsiella terrigena*. *J. Arch. Biochem. Biophysic.* 341:201-209.
- Greiner, R., U. Konietzny, and K.I.D. Jany. 1993. Purification and Characterization of Two Phytase from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* 303: 107-113.
- Gull, I., Amber, H., M. S. Shahbaz., and M. A. Athar. 2013. Optimization of Phytase Production in Solid State Fermentation by Different Fungi. *African Journal of Microbiology.* 7(45): 5207-5212.
- Han, Y. W., D. J. Gallagher, and A. G. Wilfred. 1987. Phytase Production by *Aspergillus ficuum* on Semisolid Substrate. *J. Industrial Microbiol.* 2: 195-200.
- Harti, A.S. 2015. *Mikrobiologi Kesehatan*. Andi, Yogyakarta.
- Irving, G.C.J. and D.J. Cosgrove. 1970. Inositol Phosphate Phosphatases of Microbiological Origin Some Properties of a Partially Purified Bacterial (*Pseudomonas* sp.) Phytase. *Aust. J. Biol. Sci.* 24: 547-557.
- Johnson, L. and Tate , M. 1969. The Structure of *Myo-inositol* Pentaphosphates. *Ann. A. N. Acad. Sci.* 165: 526-535.
- Kusumawidjaja, A. P., Tutik, B., Sajidan., dan N. N. T. Puspaningsih. 2010. Karakterisasi Ekstrak Kasar Fitase Termofilik dari Bakteri Kawah Ijen Banyuwangi, Isolat AP-17. *Jurnal Berkala Penelitian Hayati.* 16: 9-14.
- Lamid, Mirni., N. N. T., Puspaningsih., dan O., Asmarani. 2014. Potensi Enzim Fitase Asal Bakteri Rumen Terhadap Analisis SEM Perubahan Struktur Dedak Padi sebagai Pakan Ayam Pedaging. *Veterinaria Medika.* 7(1).
- Lott, J. N. A., I. Ockenden., V. Raboy., dan G.D. Batten. 2000. Phytic Acid and Phosphorus in Crop Seeds and Fruits: a Global Estimate. *Seed Sci Res.* 10: 11–33.
- Madigan , M. T., J. M. Martinko, K. S. Bender, D. H. Buckley, and D. A. Stahl. 2012. *Brock Biology of Microorganisms Fourteenth Edition.* 151-160.

- Maenz, D.D. 2001. Enzymatic Characteristic of Phytase as They Relate to Their use in Animal Feeds. In: M.R. Bedford and G.G. Partridge (eds). *Enzymes in Farm Animal Nutrition*. CABI Publishing, USA. 61-84.
- Ompusunggu, H. E. S., Juwita., dan R. Silaban. . Kajian Biomedik Enzim Amilase dan Pemanfaatannya dalam Industri. *Artikel*. Universitas Medan.
- Pujaningsih, R. I. 2004. Aktivitas Enzim Fitase dalam Upaya Peningkatan Ketersediaan Fosfor pada Fermentasi Dedak Padi dengan Cairan Rumen. *Jurnal Indon Trop Anim Agric*. 28 (2).
- Ranjan K, Sahay S. 2013. Identification of Phytase Producing Yeast and Optimization and Characterization of Extracellular Phytase from *Candida parapsilosis*. *IJSN*. 4(4): 583-590.
- Richardson, N. L., Higgs, D. A., Beames, R. M. and McBride, J. R. 1995. Influence of Dietary Calcium, Phosphorus, Zinc and Sodium Phytate Level on Cataract Incidence, Growth and Histopathology in Juvenile Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *J. Nutr*. 115: 553-567.
- Santos, Tania. 2011. Optimisation of Fitase Production by *Aspergillus niger* Using Solid State Fermentation. *Thesis*. National University of Ireland for the degree of Master of Science.
- Scoot, J. J. and Loewus, F. A .1986. A Calcium Activated Phytase from Pollen of *Lilium longiflorum*. *Plant Physiol*. 82: 333-335.
- Selle, P. H. and V. Ravindran. 2007. Microbial Phytase in Poultry Nutrition. *Anim. Feed Sci. Technol*. 135: 1-41.
- Shahib, N. 2005. *Biologi Molekular Medik I*. Unpad Press. Bandung. 164-167.
- Shieh, T.R. and J.H. Ware. 1968. Survey of Microorganisms for The Production of Extracellular Phytase. *Appl. Microbiol*. 16 (9): 1348-1351.
- Shuler, M. L. and F. Kargi. 2002. *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*. 2<sup>nd</sup> Edition. Englewood Cliffs, New Jersey.
- Stefan, H., K. Anja., S. Edzard., Bijoerg., L. Marcus., Z. Oskar. 2005. Biotechnological Production and Application of Phytase. *App. Microbiol Biotech*. 68 (5): 125-140.
- Sumardjo, Damin. 2009. *Pengantar Kimia: Buku Panduan Kuliah Mahasiswa Kedokteran dan Program Strata I Fakultas Bioeksakta*. EGC, Jakarta.
- Tortora, G.J., B.R. Funke, and C.L. Case. 2007. *Microbiology an Introduction*, 9<sup>th</sup> ed. Benjamin Cummings, USA.
- William, P. J. and Taylor, T. G. 1985. A Comparative Study of Phytate Hydrolysis in the Gastrointestinal Track of the Golden Hamster (*Mesocricetus auratus*) and The Laboratory rat. *Br. J. Nutr*. 54: 429-435.
- Yao MZ, ZhangYH, Lu WL, Hu MQ, Wang W, Liang AH. 2011. Phytases: Crystal Structures, Protein Engineering and Potential Biotechnological Applications. *J. App. Microbiol*. 112: 1-14.
- Zhou, Xiao Ling, Wei, Shen, Jian, Zhuge, and Zheng, Xiang Wang. *Biochemical Properties Of A Thermostable Fitase from Neurospora crassa*. 258 (1): 61-66

