

## SCREENING OF THERMOPHYLIC MICROORGANISM FROM IJEN CRATER BANYUWANGI AS PHYTASE ENZYME PRODUCER

### Screening Mikroorganisme Termofilik Penghasil Enzim Fitase yang Tumbuh Di Kawah Ijen Banyuwangi

Aline Puspita Kusumadjaja<sup>1,\*</sup>, Tutuk Budiati<sup>2</sup>, Ni Nyoman Tri Puspaningsih<sup>3</sup>, and Sajidan<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Science, Surabaya State University

<sup>2</sup>Faculty of Pharmacy, Airlangga University

<sup>3</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Airlangga University

<sup>4</sup>Department of Biology, Faculty of Teacher Training and Education, Surakarta State University

Received May 28, 2009; Accepted October 12, 2009

#### ABSTRACT

Phytase is enzyme which hydrolysis phytic acid to anorganic phosphate and myo-inositol pentakis-, tetrakis-, tris-, bis-, and monophosphate. The use of phytase in feed industry can overcome environment and nutrition problems which were arisen from unmetabolism phytic acid or its salt by poultry, swine and fish. The feed industry needs a thermostable enzyme due to the need of high temperature in pelleting process, i.e. 81 °C. By using thermostabile phytase, the pelleting process will not affect the enzyme activity. Thermostabile phytase can be isolated from microorganism live in hot spring water or volcano crater. In this study, the screening of thermophilic microorganism having thermostabile phytase activity in Ijen Crater, Banyuwangi, has been done. From this process, it was obtained 33 isolates that produce phytase enzyme. Isolate was code by AP-17 yields highest phytase activity, that is 0.0296 U/mL, so this isolate was choosen for further study. The activity of crude phytase enzyme was measured based on the amount of anorganic phosphate that was produced in enzymatic reaction using UV-VIS spectrophotometer at 392 nm. Based on morphology test to identify the gram type of microorganism, isolate AP-17 has a bacill cell type and identified as positive gram bacteria. This isolate was assumed as *Bacillus* type.

**Keywords:** Phytase, thermophilic microorganism, phytase activity

#### PENDAHULUAN

Salah satu enzim yang berpotensi dikembangkan dalam dunia industri terutama industri pakan ternak adalah enzim fitase. Fitase atau mio-inositol heksakisfosfat fosfohidrolase adalah enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis ikatan fosfoester pada asam fitat (mio-inositol heksakisfosfat), menghasilkan fosfat anorganik dan ester-ester fosfat dari mio-inositol yang lebih rendah [1].

Asam fitat merupakan salah satu komponen penting yang terdapat pada beberapa jenis tanaman seperti jagung, kedelai, kacang-kacangan, gandum, biji-bijian dan lain-lain. Tanaman-tanaman ini merupakan sumber makanan utama bagi hewan ternak seperti babi, ayam, ikan, burung, itik, dan digunakan sebagai bahan baku pada pembuatan pakan ternak. Sekitar lebih dari 80% dari total mineral fosfor yang terdapat pada sumber makanan tersebut di atas, tersimpan dalam bentuk asam fitat atau garamnya [2].

Sistem pencernaan atau monogastrik hewan ternak tidak dapat mencerna atau memetabolisme asam

fitat. Pada kondisi fisiologis, asam fitat dapat membentuk kelat dengan mineral Ca, Mg, Fe dan Zn sehingga menghambat pemanfaatan logam-logam tersebut di dalam tubuh [3]. Asam fitat juga dapat membentuk kompleks dengan asam-asam amino, protein, sehingga menghambat fungsi biokimiawi asam amino maupun protein tersebut. Di samping itu asam fitat merupakan inhibitor bagi enzim-enzim pencernaan.

Asam fitat yang tidak termetabolisme dalam sistem pencernaan hewan ternak, juga menimbulkan problem lingkungan karena asam fitat tersebut akan diekresikan hewan ternak melalui kotorannya. Gugus fosfat yang terakumulasi menyebabkan terjadinya polusi pada lingkungan hidup [4].

Tidak adanya enzim yang mampu mendegradasi asam fitat di dalam sistem monogastrik hewan ternak, menyebabkan perlu ditambahkannya mineral fosfat anorganik pada makanan hewan ternak tersebut untuk mencukupi kebutuhan akan fosfor. Penambahan mineral fosfat dalam pakan ternak menyebabkan kenaikan biaya produksi.

\* Corresponding author.  
Email address : aline\_k4@yahoo.com

Masalah-masalah tersebut di atas dapat diatasi dengan menggunakan enzim fitase sebagai suplemen dalam pakan ternak. Sebanyak 22 negara di antaranya Belanda, Jerman, Korea, Taiwan, Amerika Serikat menggunakan fitase pada industri pakan ternaknya. Penggunaan fitase dapat mengurangi efek anti nutrisi asam fitat, dan mengatasi problem lingkungan yang disebabkan ekskresi berlebih mineral fosfat oleh hewan ternak. Di Amerika Serikat, penggunaan fitase menghalangi pelepasan atau terbuangnya gugus fosfat ke lingkungan sebesar  $8,23 \times 10^4$  ton per tahun, dan menghemat biaya penggunaan fosfor dalam pakan ternak sebesar 168 million US dollars per tahun [5].

Dewasa ini, enzim fitase yang digunakan secara komersial berasal dari mikroorganisme mesofil, terutama dari golongan *Aspergillus*. Enzim fitase dari *Aspergillus* memiliki suhu optimum sekitar 50 °C. Enzim ini tidak tahan terhadap suhu tinggi, aktivitasnya akan menurun jika dipaparkan pada suhu tinggi. Proses industri, terutama pada industri pakan ternak, membutuhkan fitase termofilik atau yang tahan terhadap suhu tinggi karena pada proses pembuatan pelet untuk menghasilkan pakan ternak, digunakan suhu 80-90 °C [6]. Penelitian mengenai enzim fitase termofilik dengan demikian perlu dikembangkan.

Pada penelitian ini, dilakukan *screening* mikroorganisme termofilik yang mampu menghasilkan fitase, yang berasal dari Kawah Ijen Banyuwangi. Selanjutnya, dilakukan uji pewarnaan terhadap isolat penghasil fitase dengan aktivitas terbesar, guna mengidentifikasi isolat tersebut.

## METODE PENELITIAN

### Bahan

Sampel dari Kawah Ijen Banyuwangi, media Luria Bertani (LB), media *screening* fitase, amonium molibdat, ammonium vanadat,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , kristal violet, alkohol, lugol, safranin, TCA, asam nitrat pekat.

### Alat

*Shaker incubator, incubator, UV-1700 Shimadzu Recording Spectrophotometer, sentrifus.*

### Prosedur Kerja

#### **Screening Mikroorganisme Yang Memiliki Aktivitas Fitase**

Sebanyak 1% sampel air Kawah Ijen diinokulasikan ke dalam media Luria Bertani (LB) cair dengan komposisi *bacto-triptone* 1% (b/v), *yeast extract* 0,5% (b/v), dan NaCl 1% (b/v), dan dikocok dengan *shaker incubator* selama 24 jam pada suhu 50 °C,

kecepatan 200 rpm. Selanjutnya, kultur cair divortex hingga homogen dan *dispread* pada media LB padat, serta diinkubasi selama 24 jam pada suhu 50 °C untuk mendapatkan koloni-koloni tunggal. Koloni-koloni tunggal yang diperoleh ditumbuhkan pada 10 mL media *screening* cair, dengan komposisi glukosa 2% (b/v), Na-fitat 0,4% (b/v),  $\text{CaCl}_2$  0,2% (b/v),  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0,5% (b/v), KCl 0,05% (b/v),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,05% (b/v),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,001% (b/v), dan  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,001% (b/v), kemudian dikocok dengan *shaker incubator* pada suhu 50 °C dengan kecepatan 200 rpm selama 24 jam. Kultur cair dari masing-masing koloni disentrifus dengan kecepatan 4000 rpm suhu 4 °C selama 20 menit. Selanjutnya filtrat yang diperoleh diuji konsentrasi fosfat organikya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 392 nm.

#### **Penentuan Aktivitas Fitase**

Sebanyak 1 mL larutan enzim diinkubasi dengan 1 mL Na-fitat 2 mM yang mengandung  $\text{CaCl}_2$  1 mM, pada suhu 50 °C selama 15 menit [4]. Berikutnya ditambahkan 2 mL TCA 5%, dan masing-masing campuran enzim-substrat dидiamkan pada suhu 4 °C selama 15 menit. Kemudian disentrifus dengan kecepatan 4.000 rpm selama 20 menit. Sebanyak 2 mL supernatan direaksikan dengan 2 mL reagen molibdat-vanadat. Terakhir, diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis, pada panjang gelombang 392 nm dan dilakukan 3x pengulangan.

#### **Pewarnaan Gram**

Mikroorganisme diambil 1 ose dan dioleskan di atas preparat. Sebanyak 3 mL larutan kristal violet (3 g dalam 100 mL alkohol dan 900 mL aquades) ditetaskan di atas preparat dan dидiamkan selama 2 menit. Mikroorganisme yang sudah ditetesi kristal violet selanjutnya ditetesi lugol di atasnya, dilanjutkan dengan alkohol sebanyak 3 mL, lalu preparat dibasuh dengan aquades. Sebanyak 3 mL safranin ditetaskan di atas preparat dan dидiamkan selama 1 menit. Lalu preparat dicuci kembali dengan aquades dan diletakkan dalam posisi miring untuk mempercepat pengeringan. Setelah preparat kering, dilakukan pengamatan di bawah mikroskop.

#### **Analisis Data**

Satu unit aktivitas enzim fitase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang mengkatalisis reaksi yang menghasilkan 1,0  $\mu\text{mol}$  fosfat anorganik per menit pada kondisi optimum. Penentuan konsentrasi fosfat anorganik dilakukan dengan menggunakan reagen amonium molibdat-vanadat. Kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-VIS pada

panjang gelombang 392 nm. Untuk pembuatan kurva kalibrasi digunakan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Screening Mikroorganisme Yang Memiliki Aktivitas Fitase

Sebanyak 1 % sampel air Kawah Ijen diinokulasi pada media LB cair lalu *dishaker* selama 24 jam pada suhu 50 °C dengan kecepatan 200 rpm. Kultur yang tumbuh di LB cair selanjutnya *dispread* ke LB padat untuk mendapatkan koloni tunggal. Koloni tunggal sel mikroorganisme merupakan sekelompok masa sel yang dapat dilihat dengan mata langsung. Semua sel dalam koloni itu sama dan dianggap semua sel itu merupakan progeni (keturunan) satu mikroorganisme dan karena itu mewakili sebagai biakan murni [7].

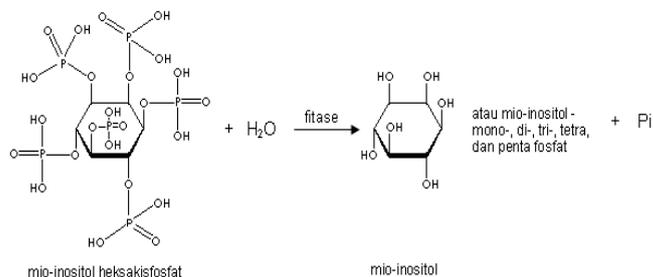
Pada penelitian ini berhasil diperoleh 83 koloni tunggal. Koloni-koloni tunggal ini selanjutnya secara berturut-turut dikode dengan kode AP-01, AP-02,

sampai dengan AP-83. Semua koloni tunggal yang diperoleh selanjutnya diuji aktivitas fitasenya dengan mengukur kadar fosfat anorganik yang dihasilkan setelah koloni-koloni tersebut ditumbuhkan pada media *screening* cair. Ternyata, dari 83 koloni tunggal yang diinokulasikan pada media *screening* cair, hanya 33 isolat yang dapat tumbuh.

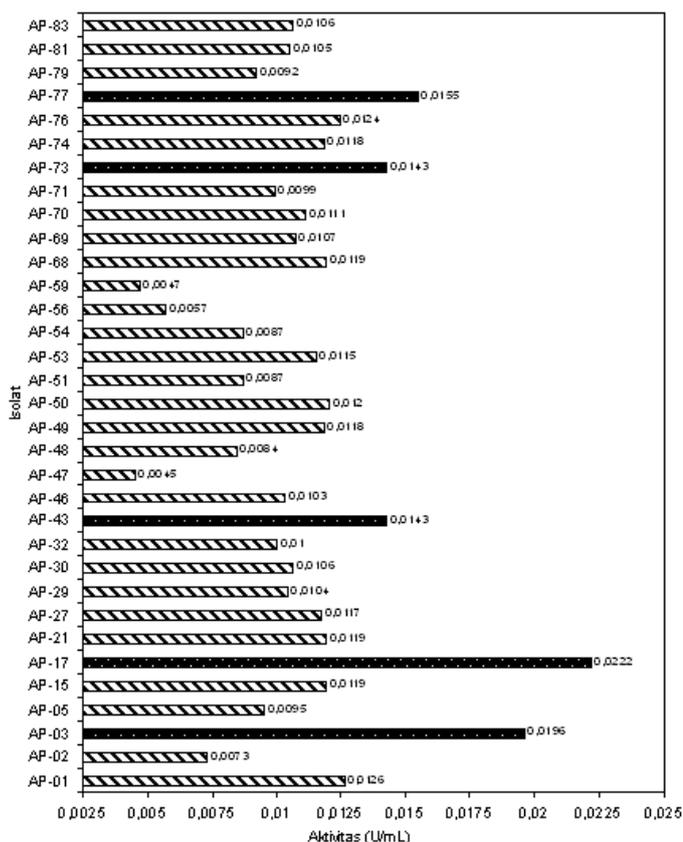
Isolat-isolat yang tumbuh dalam media *screening* cair diprediksi mampu menghasilkan enzim fitase karena dengan adanya enzim ini, fitat yang ada dalam media *screening* akan terdegradasi menjadi fosfat anorganik. Dengan demikian, kebutuhan mikroorganisme akan fosfat anorganik yang tidak ada dalam media *screening* menjadi terpenuhi karena kerja enzimatik.

Enzim fitase, dapat dihasilkan oleh ke-33 isolat ini, karena inducer yang terdapat dalam media *screening* akan menginduksi gen fitase yang dimiliki isolat - isolat tersebut sehingga terekspresi. Sementara isolat-isolat yang tidak tumbuh memiliki dua kemungkinan. Pertama, isolat tersebut memang tidak memiliki gen fitase, dan yang kedua, isolat tersebut sebenarnya memiliki gen fitase tetapi gen fitase ini tidak berhasil diekspresikan. Induksi fitase sangat bergantung pada dua hal yaitu Na-fitat dan tidak adanya fosfat anorganik dalam media *screening* [8].

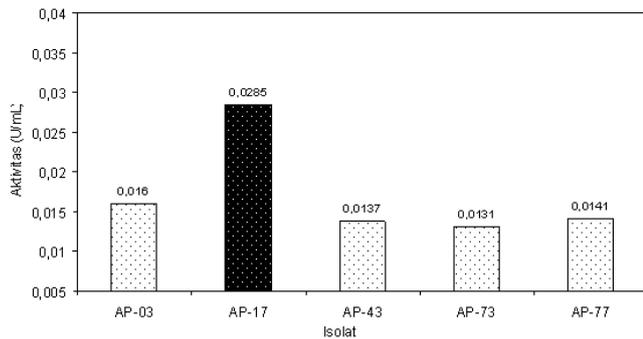
Aktivitas fitase yang dihasilkan ke-33 isolat yang tumbuh pada media *screening* diilustrasikan pada Gambar 1. Aktivitas fitase ditentukan dengan cara mengukur kadar fosfat yang dihasilkan selama berlangsungnya reaksi enzimatik. Pengukuran aktivitas fitase pada penelitian ini adalah dengan mereaksikan filtrat kultur cair yang mengandung ekstrak kasar enzim dengan Na-fitat, lalu diinkubasi pada suhu 50 °C selama 15 menit. Inkubasi dilakukan pada 50 °C karena menyesuaikan dengan suhu Kawah Ijen. Reaksi enzimatik yang terjadi selama inkubasi berlangsung adalah [9].



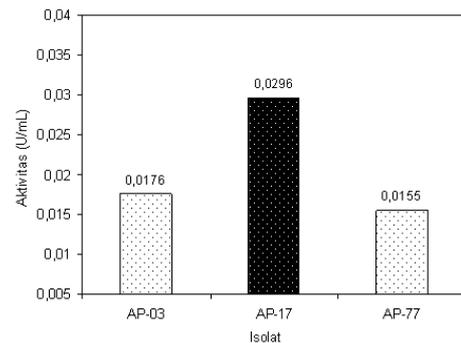
Fosfat anorganik yang terbentuk selanjutnya direaksikan dengan reagen molibdat-vanadat dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 392 nm. Penentuan kadar fosfat dengan metode spektrofotometri ini didasarkan pada pembentukan kompleks asam vanadomolibdofosforik. Dalam suasana asam, senyawa fosfat anorganik yang



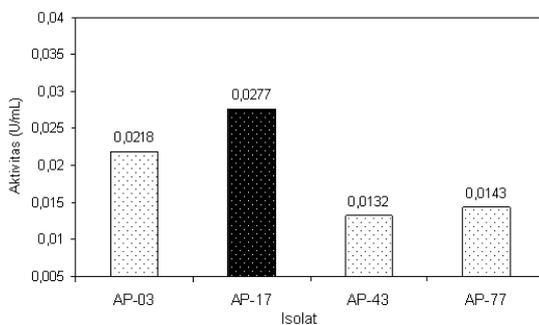
**Gambar 1.** Aktivitas fitase 33 isolat Kawah Ijen. Diagram batang berwarna hitam menunjukkan 5 isolat terpilih untuk pengujian aktivitas lebih lanjut karena di antara 33 isolat tersebut di atas, ke-5 isolat ini mampu menghasilkan fitase dengan aktivitas terbesar.



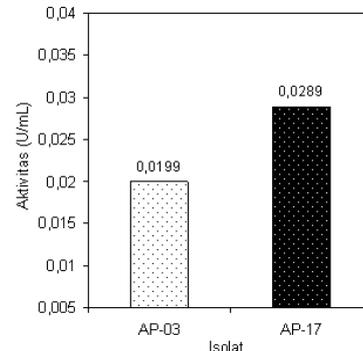
**Gambar 2.** Aktivitas fitase 5 isolat terpilih Kawah Ijen yang mampu menghasilkan fitase dengan aktivitas terbesar. Diantara 5 isolat tersebut, isolat berkode AP-17 memiliki aktivitas fitase yang paling besar yaitu 0,0285 U/mL.



**Gambar 4.** Aktivitas fitase 3 isolat terpilih Kawah Ijen yang mampu menghasilkan fitase dengan aktivitas terbesar. Diantara 3 isolat tersebut, isolat berkode AP-17 memiliki aktivitas fitase yang paling besar yaitu 0,0296 U/mL.



**Gambar 3.** Aktivitas fitase 4 isolat terpilih Kawah Ijen yang mampu menghasilkan fitase dengan aktivitas terbesar. Diantara 4 isolat tersebut, isolat berkode AP-17 memiliki aktivitas fitase yang paling besar yaitu 0,0277 U/mL.

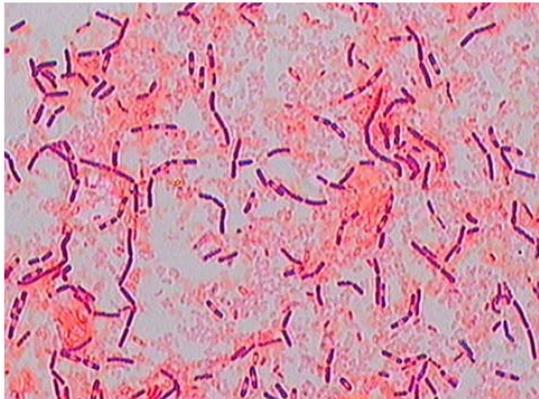


**Gambar 5.** Aktivitas fitase 2 isolat terpilih Kawah Ijen yang mampu menghasilkan fitase dengan aktivitas terbesar. Diantara 2 isolat tersebut, isolat berkode AP-17 memiliki aktivitas fitase yang paling besar yaitu 0,0289 U/mL.

terdapat dalam filtrat bereaksi dengan reagen amonium molibdat membentuk kompleks asam molibdofosforik. Dengan adanya amonium vanadat akan terbentuk senyawa kompleks asam vanadomolibdofosforik yang berwarna kuning. Senyawa kompleks asam vanadomolibdofosforik mengabsorpsi cahaya pada panjang gelombang 392 nm. Absorbansi dari senyawa kompleks tersebut berbanding lurus dengan kadar fosfat. Berpedoman pada kurva standard (persamaan garis lurus) yang telah dibuat sebelumnya, dan memasukkan absorbansi ke dalamnya, maka kadar fosfat dapat diketahui. Unit aktivitas fitase dapat dihitung berdasarkan definisi aktivitas fitase, yaitu jumlah enzim yang diperlukan untuk melepaskan 1 mikromol fosfat anorganik permenit pada kondisi pengukuran [10].

Hasil penelitian, seperti diilustrasikan pada Gambar 1, menunjukkan bahwa 5 isolat yang memiliki aktivitas fitase terbesar adalah AP-3, AP-17, AP-43, AP-73, dan AP-77, di mana masing-masing isolat ini, berturut-turut memiliki aktivitas sebesar: 0,0196; 0,0222; 0,0143; 0,0143; dan 0,0155 U/mL. Terhadap ke-5 isolat ini dilakukan beberapa kali pengujian lagi untuk

menentukan isolat penghasil fitase dengan aktivitas terbesar. Seperti diilustrasikan pada Gambar 2, Gambar 3, Gambar 4, dan Gambar 5, isolat berkode AP-17 merupakan isolat yang mampu menghasilkan fitase dengan aktivitas terbesar yaitu 0,0296 U/mL sehingga AP-17 merupakan isolat terpilih untuk penelitian lebih lanjut. Aktivitas fitase yang dihasilkan AP-17 memang lebih kecil jika dibandingkan dengan aktivitas fitase yang dihasilkan *B. subtilis* (0,044 U/mL) [11], *B. cereus* ASUIA260 (1,160 U/mL) [12] dan *Selemonas ruminantium* JY35 (0,703 U/mL) [13], tetapi AP-17 merupakan bakteri termofilik yang mampu tumbuh pada suhu 50 °C. Bakteri termofilik mampu menghasilkan enzim termostabil yang tahan terhadap pemanasan suhu tinggi, sehingga dapat diharapkan fitase yang dihasilkan AP-17 merupakan enzim termostabil yang tahan terhadap pemanasan suhu tinggi.



**Gambar 6.** Hasil pewarnaan isolat AP-17. Sel bakteri berbentuk batang dan memiliki endospora.

#### Karakterisasi Isolat AP-17

Isolat AP-17 memiliki karakteristik koloni sebagai berikut : berwarna putih, berbentuk bulat, tepi tidak rata, memiliki elevasi yang rata, dan tidak tembus cahaya. Selain pengamatan terhadap karakteristik koloni, terhadap isolat AP-17 dilakukan pula uji pewarnaan gram. Pada uji pewarnaan, zat pewarna kristal violet akan membentuk senyawa kompleks dengan lugol. Beberapa jenis bakteri melepaskan zat pewarna dengan mudah apabila dicuci dengan larutan alkohol 95%. Pada bakteri lain, zat pewarna tetap bertahan walaupun dicuci dengan alkohol 95%. Bakteri yang tidak dapat menahan zat pewarna setelah pencucian dengan alkohol 95% disebut bakteri gram negatif, sedangkan yang dapat menahan zat pewarna disebut gram positif. Karena bakteri gram negatif tidak berwarna setelah dicuci dengan alkohol, maka diberikan zat warna lain sebelum diamati di bawah mikroskop. Zat pewarna lain itu biasanya ialah zat pewarna merah safranin, dan karena itu, bakteri gram negatif berwarna merah. Karena alkohol tidak dapat mencuci zat pewarna ungu dari sel gram positif, zat pewarna safranin sebagai zat pewarna tandingan tidak berpengaruh, dan sel gram positif akan tampak berwarna ungu. Perbedaan pewarnaan pada sel bakteri gram positif dan gram negatif disebabkan perbedaan dinding sel bakteri gram positif dan gram negatif. Kompleks zat pewarna kristal violet-lugol nampaknya terperangkap di antara dinding sel dan membran sitoplasma bakteri gram positif, sedangkan penyingkiran lipida dari dinding sel bakteri gram negatif dengan pencucian alkohol memungkinkan kompleks zat pewarna kristal violet-lugol dapat disingkirkan dari sel [7].

Dari hasil pewarnaan gram, seperti diilustrasikan pada Gambar 6, isolat AP-17 merupakan bakteri gram positif berbentuk batang, dan memiliki endospora berbentuk oval yang terletak secara subterminal. Berdasarkan uji pewarnaan gram, diduga isolat AP-17 merupakan bakteri golongan *Bacillus*.

#### KESIMPULAN

Melalui proses *screening* mikroorganisme yang tumbuh di Kawah Ijen Banyuwangi, diperoleh 33 isolat termofilik penghasil fitase. Isolat berkode AP-17 merupakan isolat penghasil fitase dengan aktivitas terbesar yaitu 0,0296 U/mL. AP-17 diduga merupakan kelompok *Bacillus*.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Wyss, M., Brugger, R., Kronenberger, A., Remy, R., Fimbel, R., Oesterhelt, G., Lehmann, M., and van Loon, A.P.G.M., 1999b, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 367-373.
- Konietzny, U. and Greiner, R., 2004, *Braz. J. Microbiol.*, 35, 11-18.
- Deshpande, S.S. and Cheryan, M., 1984, *J. Food Sci.*, 49, 516-524.
- Boyce, A., Casey, A., and Walsh, G., 2004, *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, 32, 336-340.
- Wodzinski, R.J. and Ullah, A.H., 1996, *Adv. Appl. Microbiol.*, 42, 263-302.
- Xueying, W., Upatham, S., Panbangred, W., Isarangkul, D., Sumppunn, P., Wiyakrutta, S., and Meevootisom, V., 2004, *Sci. Asia*, 30, 383-390.
- Irianto, K., 2006, *Mikrobiologi : Menguk Dunia Mikroorganisme*, Jilid 1, Cetakan 1, CV.Yrama Widya, Bandung.
- Sajidan, A., Farouk, A., Greiner, R., Jungblut, P., Muller, E.C., and Borriss, R., 2004, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 65, 110-118.
- Ravindran, V., Cabahug, S., Ravindran, G., and Bryden, W.L., 1999, *Poult. Sci.*, 78, 699-706.
- Kerovuoto, J., Lauraeus, M., Nurminen, P., Kalkkinen, N., and Apajalahti, J., 1998, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 2079-2085.
- Shimizu, M., 1992, *Biosci. Biotechnol., Biochem.*, 56, 1266-1269.
- Shobirin, A.M.H., Farouk, A., and Greiner, R., 2009, *Afr. J. Biotechnol.*, 8, 15, 3540-3546.
- Yanke, L.J., Bae, H.D., and Selinger, L.B., and Cheng, K.J., 1998, *Microbiol.*, 144, 1565-1573.