

Karakterisasi Fitase dari *Bacillus coagulans*

Sri Widowati, D. Andriani, E.I. Riyanti, P. Raharto, dan L. Sukarno

Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor

ABSTRAK

Fitase (mio-inositol heksakisfosfat fosfohidrolase, E.C. 3.1.3.8.) merupakan suatu fosfomonoesterase yang mampu menghidrolisis asam fitat menjadi orto-fosfat anorganik dan ester-ester fosfat dari mio-inositol yang lebih rendah. Asam fitat adalah sejenis ester fosfat yang dapat mengikat mineral penting (Ca^{++} , Fe^{++} , Mg^{++}) dan protein sehingga sulit diserap tubuh. Pemanfaatan fitase untuk menurunkan kadar asam fitat dalam bahan makanan dan meningkatkan nilai cernanya, perlu memperhatikan karakteristik enzim, sehingga enzim bekerja pada kondisi aktivitas optimumnya. Fitase yang digunakan berasal dari *Bacillus coagulans* E.1.4.4., dilakukan semipurifikasi, yaitu dengan metode pengendapan garam amonium sulfat 70%, dilanjutkan dengan dialisis. Fraksi hasil dialisis kemudian dikarakterisasi. Hasil penelitian menunjukkan aktivitas spesifik fitase hasil dialisis ialah 0,8754 U/mg protein dengan kemurnian 1,83 kali. Enzim tersebut memiliki aktivitas optimum pada suhu 40°C dan pH 6,0. Penurunan aktivitas enzim terjadi bila konsentrasi substrat >0,7 mM. Nilai K_m yang diperoleh dari kurva Lineweaver-Burk sebesar 0,562 mM, V_{maks} 0,73 $\mu\text{mol PO}_4^{-3}$ /menit/ml. Mineral kalsium, mangan, dan magnesium dapat berperan sebagai aktivator bagi fitase *B. coagulans*, sedangkan besi sebagai inhibitorynya.

Kata kunci: Fitase, *Bacillus coagulans*, fitat, karakteristik enzim

ABSTRACT

Phytase (mio-inositol hexacysphosphate, E.C. 3.1.3.8) is phosphomono esterase which has capability to hydrolyze of phytic acid to be ontophosphate anorganic and phosphate esters from lower mio-inositol. Phytic acid is a phosphate ester which could bond the important minerals (Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+}) and protein, therefore reduce of its digestibility. Application of phytase to reduce phytic acid and to increase of digestibility in food products should note the characteristic of enzyme, so it could work an its optimum activity. Phytase used from *Bacillus coagulan* E.1.4.4 after it purified by precipitas using amomilim shephate 70% and dialysis. The fraction result from dialysis is characterised. Result show that specific activity phytase 0.8754 U/mg prot with purification 1.83 time. The enzyme has optimum activity at 40°C and pH 6.0. Enzyme activity will reduce when substrate concentration >0.7 mM. K_m value from its lineweaver-Burk curve is 0.562 mM, V_{max} 0.73 $\mu\text{mol PO}_4^{-3}$ /minute/ml. The minerals Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} have roles as activator for phytase from *B. coagulans* E1.4.4, while Fe^{2+} an inhibitor.

Key words: Phytase, *Bacillus coagulans*, phytate, enzyme characteristics

PENDAHULUAN

Asam fitat (mio-inositol heksakisfosfat) merupakan bentuk penyimpanan fosfor yang terbesar pada tanaman serealia dan leguminosa. Pada kondisi alami, asam fitat akan membentuk ikatan baik dengan mineral bervalensi dua (Ca^{++} , Mg^{++} , Fe^{++} , dan lain-lain), maupun protein menjadi senyawa yang sukar

larut. Hal ini menyebabkan mineral dan protein tidak dapat diserap tubuh, atau nilai cerna-nya rendah. Oleh karena itu, asam fitat dianggap sebagai antinutrisi pada bahan pangan. Muchtadi (1998) menyebutkan bahwa asam fitat sangat tahan terhadap pemanasan selama pengolahan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa produk olahan kedelai tanpa fermentasi tetap mengandung asam fitat. Tahap fermentasi dapat mengurangi, bahkan menghilangkan asam fitat, sehingga tempe dan kecap sudah tidak mengandung senyawa tersebut. Tangenjaya (1979) melaporkan bahwa pemanasan pada suhu 100°C, pH 2 selama 24 jam dapat mengurangi kadar fitat sampai dengan 70%. Meskipun asam fitat dapat dikurangi dengan cara pemanasan, tetapi cara ini tidak efektif dan dapat merusak komponen gizi lain, terutama protein dan vitamin. Cara lain ialah dengan memanfaatkan fitase yang dapat menghidrolisis asam fitat secara bertahap menjadi senyawa turunannya, yang dapat larut dan terserap dalam sistem pencernaan.

Fitase (mio-inositol heksakisfosfat fosfohidrolase, E.C. 3.1.3.8) merupakan suatu fosfomonoesterase yang mampu menghidrolisis asam fitat menjadi ortofosfat anorganik dan ester-ester fosfat dari mio-inositol yang lebih rendah. Pada kondisi tertentu bahkan menjadi fosfat dan mio-inositol bebas. Fitase tersebar luas dalam tanaman, jaringan hewan atau usus halus, serta beberapa spesies kapang dan bakteri (Cosgrove, 1980).

Bahan makanan dari tumbuhan yang mengandung fitase antara lain gandum, gandum hitam, barley, jagung, padi dan hasil sampingnya. Akan tetapi, menurut Tempterton *et al.* (1965) yang dikutip oleh Lolos dan Markakis (1977) fitase tidak stabil dalam bahan makanan, sehingga tidak dapat diharapkan sebagai sumber enzim. Distribusi fitase dalam tanaman tidak seimbang dengan kandungan fitatnya dan ada kemungkinan aktivitas enzim fitase dihambat oleh kandungan fitat yang tinggi.

Enzim yang diisolasi dari mikroba memiliki beberapa keunggulan, antara lain potensi produksinya tidak terbatas, produksi fitase mikroba dalam memproduksi enzim dapat ditingkatkan, perbanyak mikroba relatif mudah dan murah serta dapat dikendalikan.

Aktivitas fitase pada mikroorganisme terutama ditemukan pada kapang, khususnya *Aspergillus* spp. Menurut Shieh dan Ware (1968) aktivitas fitase ekstra-seluler yang tinggi ditemukan pada *Aspergillus niger* dan *A. ficuum*. Enzim fitase juga dihasilkan oleh bakteri *Pseudomonas* spp. (Irving dan Cosgrove, 1970), *Bacillus subtilis*, dan *Escherichia coli* (Cosgrove, 1980).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa penambahan fitase secara ekstra-seluler pada bahan makanan memerlukan kondisi yang tepat. Oleh sebab itu, karakteristik enzim perlu diketahui, agar enzim dapat dimanfaatkan secara optimal. Fitase yang diisolasi dari spesies organisme yang berbeda memiliki karakteristik yang berbeda pula. Karakteristik enzim tergantung sumber dan lingkungan.

Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui karakter dari fitase asal *Bacillus coagulans* E.1.4.4, meliputi suhu dan pH optimum aktivitas enzim, serta pengaruh beberapa senyawa mineral terhadap aktivitas fitase.

BAHAN DAN METODE

Bahan yang digunakan untuk proses propagasi bakteri, yaitu isolat E.1.4.4 koleksi dari Laboratorium Mikrobiologi Tanah, Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan Bogor, ekstrak *malt*, *yeast*, pepton, dan glukosa. Untuk media fermentasi digunakan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 , FeSO_4 , CaCl_2 , MnSO_4 , glukosa, dan beka-tul. Uji aktivitas fitase memerlukan amonium heptamolibdat, amonium monovana-dat, HNO_3 pekat, TCA 20%, bufer asetat 0,2 M pH 6, standar asam fitat (garam dode-kanatrium) 0,5%, dan KH_2PO_4 . Pengujian aplikasi enzim dan kadar fitat diperlukan natrium asetat 0,005 M pH 7,5 dan TCA 3%. Selain itu, diperlukan pula reagen Bradford dan standar BSA untuk pengujian kadar protein.

Produksi Fitase Skala Satu liter

Sebanyak 1-2 ose isolat mikroba dalam agar miring diinokulasikan ke dalam 100 ml media propagasi. Media propagasi yang digunakan adalah ekstrak *malt yeast* (pH 6,8) dengan komposisi per liter, yaitu ekstrak *malt* 3 g, ekstrak *yeast* 3 g, pepton 0,5 g, dan glukosa 10 g. Propagasi bertujuan untuk memperbanyak jumlah bakteri yang digunakan untuk produksi enzim (Judoamidjojo *et al.*, 1992). Propagasi dilakukan pada inkubator goyang pada suhu ruang 37°C, kecepatan putaran 175 rpm selama 24 jam.

Produksi enzim dilakukan dengan menginokulasikan sebanyak 7,5% hasil propagasi ke dalam satu liter media PSM modifikasi (mengandung 0,3% fitat dari bekatul). Hal ini dilakukan sesuai dengan pernyataan Stanburry dan Whitaker (1984) bahwa banyaknya media propagasi optimal adalah 5-10%. Kondisi produksi yang digunakan sesuai dengan kondisi optimasi hasil penelitian sebelumnya, yaitu pada pH media 6,5, suhu inkubasi 37°C dan waktu inkubasi 20 jam. Produksi dilakukan dalam bioreaktor berkapasitas dua liter dengan volume kerja satu liter. Agitasi yang dilakukan selama fermentasi adalah 175 rpm dan aerasi 1 l/menit. Setelah fermentasi selesai, larutan disentrifusi pada 23.300 g (12.000 rpm dengan rotor RP 45T) selama 15 menit suhu 4°C dan diambil supernatannya sebagai fraksi enzim kasar. Enzim kasar tersebut kemudian dianalisis kadar protein dan aktivitas enzimnya.

Pemurnian Enzim

Tahap pemurnian enzim yang dilakukan meliputi *salting out* (pengendapan garam), dialisis, dan filtrasi gel. *Salting out* menggunakan amonium sulfat dan dialisis bertujuan untuk meningkatkan kemurnian dan aktivitas enzim, sedangkan filtrasi gel selain untuk meningkatkan kemurnian enzim juga untuk mengetahui berat molekul enzim tersebut.

Pada perlakuan *salting out*, enzim kasar hasil sentrifugasi dipresipitasi menggunakan amonium sulfat dengan konsentrasi kejenuhan 70%. Penambahan amonium sulfat dilakukan sedikit demi sedikit sambil diaduk pada suhu 4°C sampai seluruh amonium sulfat larut, kemudian enzim diendapkan/didiamkan semalam. Selanjutnya dilakukan pemisahan kembali dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 4.000 rpm (3.000 g) selama 30 menit pada suhu 4°C. Endapan yang diperoleh dilarutkan dengan bufer asetat 0,001 M pH 7,0, kemudian dianalisis aktivitas enzim dan kadar proteinnya.

Proses selanjutnya adalah dialisis larutan enzim hasil *salting out* menggunakan membran dialisis yang mampu menahan molekul 12.000-14.000 Dalton dan dicelupkan ke dalam wadah berisi bufer asetat 0,001 M pH 7,0 sambil diaduk dengan pengaduk magnetik. Secara berkala larutan bufer diuji dengan BaCl₂ dan diganti dengan larutan bufer yang baru. Setelah semua amonium sulfat dikeluarkan dari fraksi enzim, dilakukan uji kadar protein dan aktivitas fraksi enzim hasil dialisis.

Pemurnian tingkat akhir dilakukan dengan menggunakan kromatografi filtrasi gel. Enzim yang sebelumnya dilakukan pengeringan beku, dilewatkan pada kolom filtrasi gel Superdex G-75 berukuran 1,6 cm x 60 cm dengan detektor UV 280 nm pada suhu kamar. Eluen yang digunakan adalah bufer Tris-Cl 0,1 M pH 7,0. Elusi dilakukan dengan laju alir 1 ml/menit. Tiap fraksi yang diperoleh ditampung dan diukur aktivitas fitasenya. Fraksi-fraksi yang memiliki aktivitas fitase dikumpulkan dan dibandingkan waktu retensinya terhadap waktu retensi enzim fitase standar dengan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Tujuan dari percobaan dengan filtrasi gel ini adalah untuk mengetahui berat molekul fitase hasil produksi skala satu liter.

Analisis Aktivitas Fitase

Analisis dilakukan berdasarkan metode dari Altech Biotechnology Center yang dimodifikasi. Pereaksi molibdat-vanadat dibuat dengan mencampurkan larutan amonium heptamolibdat (20 g/400 ml) dan larutan amonium monovanadat (1 g/300 ml) ke dalam 140 ml HNO₃ pekat, lalu diencerkan hingga satu liter.

Aktivitas enzim diukur dengan memasukkan 4,5 ml bufer asetat 0,2 M pH 6,5 standar fitat 0,5% dan 1 ml enzim ke dalam erlenmeyer. Larutan diinkubasi pada 40°C selama 30 menit dalam *waterbath* (penangas air) sambil diaduk. Kontrol dibuat dengan menginkubasi 5 ml bufer asetat 0,2 M pH 6 dan 5 ml standar fitat 0,5% pada kondisi yang sama.

Ke dalam tabung reaksi dimasukkan 2 ml TCA 20% dan 2,5 ml akuades. Kemudian ke dalam tabung tersebut ditambahkan 0,5 ml larutan enzim hasil inkubasi. Untuk kontrol, ke dalam tabung reaksi yang lain dimasukkan 0,05 ml enzim, 2 ml TCA 20% dan 2,5 ml akuades, kemudian dimasukkan 0,45 ml larutan kontrol hasil inkubasi. Ke dalam masing-masing tabung ditambahkan 6,25 ml larutan molibdat-vanadat dan didiamkan selama 10 menit, kemudian diencerkan hingga 25 ml. Standar dibuat dengan melarutkan 0,3834 g KH₂PO₄

dalam 100 ml akuades, kemudian diencerkan 100 kali, sehingga tiap mililiter larutan mengandung 0,03834 mg KH_2PO_4 . Seri standar dibuat dengan mengambil 0; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 2,00; 3,00; dan 4,00 ml larutan standar kemudian masing-masing ditambah dengan 6,25 ml molibdat-vanadat, didiamkan 10 menit dan diencerkan hingga 25 ml. Larutan standar, sampel, dan kontrol diukur serapannya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang (λ) 420 nm. Aktivitas enzim dinyatakan dalam unit/ml, yang merupakan $\mu\text{mol PO}_4^{3-}$ yang dilepas per menit per mililiter enzim.

Pengujian Suhu dan pH Optimum Aktivitas Fitase

Penentuan suhu dilakukan seperti prosedur penentuan aktivitas, tetapi variabel suhu divariasikan, yaitu 36, 38, 40, 42, dan 44°C. Prosedur penentuan pH optimum dilakukan sama dengan penentuan suhu, tetapi suhu yang digunakan adalah suhu optimum aktivitas enzim dan pH divariasikan 5,5; 5,75; 6,0; 6,25; dan 6,5.

Analisis Kadar Fitase

Diambil 1 g sampel bekatul, ditambahkan 25 ml TCA 3% dalam labu pengocok, dan dikocok dengan *mechanical shaker* selama 30 menit dengan kecepatan 80%. Kemudian disentrifus pada 4.000 rpm selama 30 menit. Supernatan disaring dengan kertas saring Whatman No. 42, lalu disaring kembali dengan millipore 0,22 μm sebelum diinjeksikan ke alat KCKT. Eluen berupa larutan natrium asetat 0,005 M pH 7,5; dengan laju alir 0,3 ml/menit, kolom C18 dan dengan λ detektor 316 nm.

Analisis Nilai Cerna Protein

Sebanyak 250 mg sampel ditimbang dan dimasukkan ke dalam tabung daya cerna, kemudian ~~ditambah 15 ml pepsin 0,1% dalam~~ HCl 0,1 N. Tabung daya cerna digoyang dengan kecepatan 150 rpm, suhu 37°C selama 3 jam dengan *waterbath shaker*, dinetralkan dengan NaOH 0,5 N dan ditambah 7,5 ml *pancreatin* 0,1% dalam bufer phosphate pH 8. Tabung daya cerna tersebut digoyang kembali selama 21 jam. Padatan dipisahkan dengan menggunakan sentrifus selama 15 menit dengan kecepatan 1500 rpm, kemudian disaring dengan kertas saring yang telah ditimbang terlebih dahulu. Selanjutnya masing-masing dibilas dengan 30 ml akuades sebanyak tiga kali. Setelah itu, kertas hasil penyaringan dikeringkan pada suhu 105°C selama 24 jam. Kadar protein ditentukan dengan metode Kjeldahl.

$$\text{Daya cerna protein} = \frac{\text{Protein sampel} - \text{protein ampas}}{100\%} \times 100\%$$

$$\text{Protein sampel} = \{(\text{Bobot sampel} \times \text{persentase bahan kering}) \times \text{persentase protein sampel}\}$$

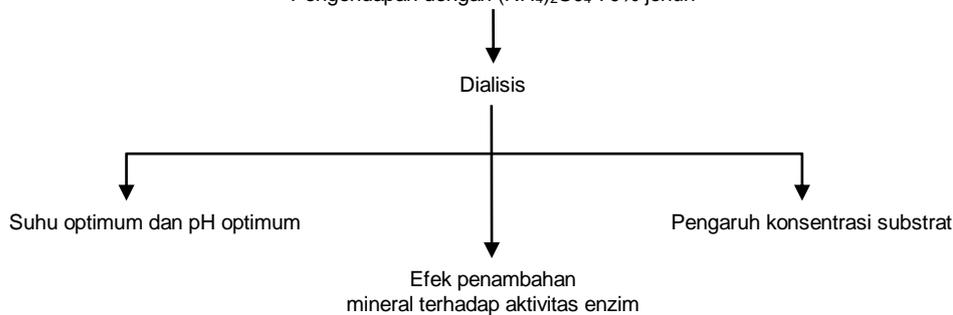
$$\text{Protein ampas} = (\text{Bobot kering ampas} \times \text{persentase protein})$$

Pengaruh Konsentrasi Substrat terhadap Aktivitas Enzim

Prosedur percobaan ini sama dengan penentuan aktivitas enzim, namun di-lakukan variasi terhadap konsentrasi substrat/dodekanatrium fitat ([S]) mulai dari 0,1 mM hingga 1 mM. Nilai yang diperoleh juga diplot ke dalam kurva Lineweaver-Burk, yaitu kurva hubungan antara $1/[S]$ dan $1/v$, untuk dihitung nilai tetapan Michaelis-Menten (K_m) enzim, melalui program komputer ENZPACK (Elsevier-Biosoft, Cambridge).

Efek Penambahan Mineral terhadap Aktivitas Enzim

Sebanyak lima labu erlenmeyer 100 ml disediakan untuk percobaan ini. Metode yang digunakan sama dengan metode penentuan aktivitas enzim, hanya saja sebelum diinkubasi, ditambahkan $MgSO_4$, $MnSO_4$, $CaCl_2$, $FeSO_4$, dan $FeCl_3$ pada masing-masing erlenmeyer, sehingga konsentrasi akhir masing-masing senyawa $2,3,3,3,3 \times 10^{-3} M$. Sebuah labu erlenmeyer lainnya disediakan tanpa penam-bahar mineral. Nilai aktivitas dari masing-masing enzim yang diberi senyawa \downarrow mine-ral akan dibandingkan relatif terhadap aktivitas enzim tanpa penambahan mineral.



Gambar 1. Diagram alir metode penelitian

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tabel 1. Hasil uji aktivitas dan kadar protein fitase

Fraksi enzim	Enzim kasar	<i>Salting out</i>	Dialisis
Volume (ml)	800	21,50	43,50
Volume terkoreksi (ml)	800	22,93	49,88
Aktivitas (U/ml)	0,5683	1,1254	1,0625
Aktivitas total (U)	454,664	25,8054	52,9975
Protein (mg/ml)	1,1885	2,2553	1,2137
Protein total (mg)	950,816	51,7140	60,5394
Aktivitas spesifik (U/mg)	0,4782	0,4990	0,8754
Kemurnian (kali)	1	1,044	1,831

Produksi dan Pengujian Aktivitas Fitase

Dalam produksi fitase dengan media PSM modifikasi sebanyak satu liter di-peroleh larutan enzim kasar sebanyak 800 ml dengan aktivitas 0,5683 U/ml. Larutan enzim kasar tersebut mengandung protein 1,1885 mg/ml, sehingga diperoleh aktivitas spesifik 0,4782 U/ml (Tabel 1).

Enzim kasar kemudian dilakukan *salting out* dengan menggunakan amonium sulfat 70% (Widowati *et al.*, 1998). Penambahan amonium pada konsentrasi tertentu akan menyebabkan daya larut protein berkurang, sehingga protein terpisah dengan endapan. Tujuan perlakuan ini untuk memekatkan enzim dan pemisahan komponen protein berdasarkan sifat ioniknya (Schopes, 1987). Hasil *salting out* menurunkan aktivitas enzim sebesar 1,1254 U/ml dengan kandungan protein 2,2553 mg/ml, sehingga diperoleh aktivitas spesifik 0,4990 U/mg.

Dialisis merupakan proses difusi selektif yang melewati membran selofan. Proses ini bertujuan untuk menghilangkan garam dan zat terlarut lainnya. Fitase hasil dialisis menunjukkan aktivitasnya sebesar 1,0625 U/mg dengan kadar protein 1,2137 mg/ml sehingga diperoleh aktivitas spesifik sebesar 0,8754 U/mg.

Filtrasi gel adalah cara pemisahan biomolekul yang sederhana dan bertujuan untuk mengetahui bobot molekul suatu biomolekul atau persenyawaan lain. Pemisahan dilakukan berdasarkan ukuran dari biomolekul itu sendiri. Cara ini cukup baik untuk purifikasi dan pemisahan biomolekul dengan rentang lebar. Dengan menggunakan filtrasi gel kinerja tinggi akan memberikan pemisahan yang cukup cepat serta hasil dengan aktivitas molekul biologi yang tetap bahkan meningkat.

Prinsip filtrasi gel adalah apabila sampel melewati kolom yang telah di-*packing* dengan agarose dengan gugus *cross link* yang tinggi, pada suatu kecepatan aliran tertentu dan tetap maka setiap biomolekul mempunyai kemampuan yang berbeda untuk melewati kolom tergantung dari ukuran molekulnya. Molekul yang lebih kecil dapat menembus ke dalam pori-pori butiran dan tertahan selama aliran ke bawah kolom, tetapi molekul protein besar tidak dapat menembus ke dalam butiran dan melewati kolom lebih

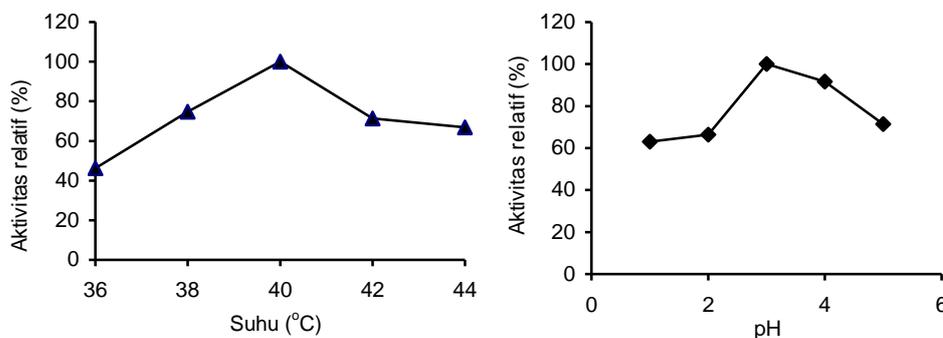
cepat. Protein berukuran menengah akan mengalir ke bawah pada kecepatan antara, tergantung kepada tingkat kemampuan menembus butiran. Untuk molekul dengan bentuk globular, lamanya waktu alir berbanding lurus dengan bobot molekul tersebut.

Berbagai macam campuran molekul atau biomolekul dapat dipisahkan dengan filtrasi gel sepanjang molekul sampel tersebut berada pada kemampuan (*range*) memfraksinasi. Misalnya kolom *sphadex/superdex* 675 mempunyai kemampuan pemisahan antara 6.000-10.000 Dalton. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bobot molekul fitase adalah 50 kilo Dalton.

Pengujian Suhu dan pH Optimum Aktivitas Fitase

Suhu dan pH enzim tergantung dari jenis dan sumber enzimnya. Beberapa pH dan suhu optimum fitase dari berbagai mikroba telah dilaporkan. Mikio (1992) mendapatkan fitase dari *B. subtilis* (natto) N-77 suhu 60°C dan pH 6,0-6,5, sedangkan dari *Enterobacter* sp. 4 pH 7,5, suhu 50°C. Fitase juga diproduksi oleh *Aspergillus niger* (suhu 58°C, pH 5,5), *Schwanniomyces castellii* (suhu 7,7°C, pH 4,4), dan *Klebsiella aerogenes* (suhu 45°C, pH 7,0).

Penentuan pH dan suhu optimum dimaksudkan untuk mendapatkan pH dan suhu yang tepat, di mana enzim bekerja dengan aktivitas tertinggi. Hasil pengujian fraksi enzim dialisis diperoleh data bahwa fitase dari *B. coagulans* memiliki aktivitas relatif tertinggi pada pH bufer 6,00 dan suhu 40°C. Aktivitas relatif enzim meningkat sebanding dengan kenaikan suhu inkubasi dan mencapai nilai maksimal pada suhu 40°C. Hal ini terjadi karena protein enzim yang terdapat di dalam sampel mengalami denaturasi pada suhu di atas 40°C sehingga kemampuannya untuk mendegradasi asam fitat menurun (Gambar 2). Aktivitas relatif enzim menunjukkan nilai maksimal pada pH bufer 6,00 sesuai dengan kondisi optimasi produksi. Nilai maksimal aktivitas relatif enzim dicapai pada pH bufer 6,00 dan setelah itu mengalami penurunan (Gambar 2). Informasi suhu dan pH optimum aktivitas enzim ini sangat bermanfaat untuk aplikasi enzim tersebut pada bahan yang akan dihidrolisis.



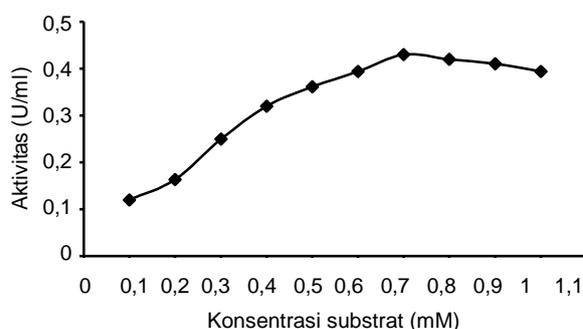
Gambar 2. Aktivitas relatif enzim terhadap suhu inkubasi dan pH bufer

Pengaruh Konsentrasi Substrat terhadap Aktivitas Enzim

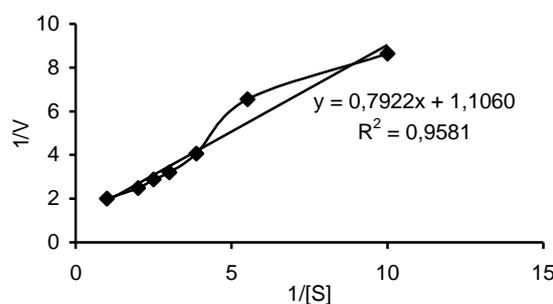
Percobaan ini dilakukan pada kondisi optimum (pH 6,0 dan suhu 40°C), dengan substrat dodekanatrium fitat. Hasilnya diplotkan ke dalam kurva Michaelis-Menten (Gambar 3).

Gambar 3 menunjukkan aktivitas fitase dari *B. coagulans* terhambat pada konsentrasi di atas 0,7 mM. Enzim fitase yang diisolasi dari spesies lain dilaporkan juga mengalami hal serupa, diinhibisi pada konsentrasi substrat tertentu. Ada dua kemungkinan mengenai inhibisi tersebut. Shieh dan Ware (1968) meneliti pengaruh fosfat terhadap fitase *A. ficuum* NRRL 3135 dan hasilnya menunjukkan adanya penurunan aktivitas fitase apabila konsentrasi fosfat meningkat. Greiner *et al.* (1993) menyatakan bahwa salah satu sebab tidak terbentuknya inositol bebas pada proses hidrolisis asam fitat dengan katalis fitase adalah karena fitase akan terhambat oleh fosfat yang dilepaskan. Enzim fosfatase lain juga menunjukkan inhibisi oleh fosfat organik (Nandi dan Sarkar 1995; Muntean 1994). Kemungkinan lain dinyatakan Irving dan Cosgrove (1970), dengan mengutip beberapa penelitian enzim fosfomonoesterase, bahwa enzim tersebut terhambat karena kompleks enzim-substrat yang cenderung tidak stabil.

Nilai K_m fitase ditentukan melalui kurva Lineweaver-Burk (Gambar 4). Dari 10 data yang ada, tujuh data awal diplotkan ke dalam kurva Lineweaver-



Gambar 3. Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas fitase



Gambar 4. Kurva Lineweaver-Burk fitase dari *B. coagulans*

Tabel 2. Efek mineral terhadap aktivitas enzim fitase

Mineral (1 mM)	Aktivitas relatif (%)
MgSO ₄	105,79
MnSO ₄	105,79
CaCl ₂	108,46
FeSO ₄	79,68
FeCl ₃	67,83

aktivitas enzim tanpa penambahan mineral dihitung sebagai 100%

Burk, sehingga diperoleh nilai K_m fitase dari *B. coagulans* sebesar 0,562 mM dan aktivitas maksimumnya (V_{maks}) 0,731 $\mu\text{mol PO}_4^{3-}/\text{menit/ml}$ (korelasi 0,96). Penggunaan tujuh data awal dilakukan dengan asumsi hingga konsentrasi 0,7 mM aktivitas enzim masih sesuai dengan kurva Michaelis-Menten.

Dari kurva Michaelis-Menten (Gambar 3) dan nilai K_m yang diperoleh, terlihat bahwa enzim belum mencapai keadaan jenuh oleh substrat ketika mulai ter-inhibisi. Dengan kata lain, aktivitas pada 0,7 mM tidak berada di sekitar V_{maks} enzim. Fenomena inhibisi fitase oleh substrat berlebih akan terlihat berupa penurunan aktivitas saat enzim seluruhnya berada pada bentuk kompleks enzim-substrat. Di sisi lain, penurunan aktivitas bukan suatu ciri dari inhibisi oleh produk. Oleh karena itu, kurva seperti pada Gambar 4 kemungkinan menunjukkan inhibisi enzim oleh substrat berlebih dan produk sekaligus. Hal ini terjadi karena

- Pada konsentrasi substrat antara 0,1-0,7 mM, enzim belum mengalami inhibisi, sehingga aktivitas terus meningkat;
- Pada konsentrasi substrat antara 0,7-1,0 mM, fosfat yang dilepas dari reaksi enzimatis telah menghambat aktivitas enzim, sehingga konsentrasi enzim bebas berkurang. Hal ini menyebabkan substrat berada pada konsentrasi berlebih dan mulai menghambat enzim pula.

Inhibisi enzim oleh fosfat menyebabkan aktivitas fitase tidak berada di sekitar aktivitas maksimum (V_{maks}), sedangkan inhibisi enzim oleh substrat berlebih menyebabkan penurunan aktivitas.

Efek Penambahan Mineral terhadap Aktivitas Fitase

Tabel 2 menunjukkan bahwa magnesium, mangan, dan kalsium memberikan efek sebagai aktivator. Pada konsentrasi 1 mM magnesium dan mangan mampu meningkatkan aktivitas fitase sebesar 5,79% dari aktivitas enzim tanpa penambahan mineral. Sedangkan kalsium meningkatkan aktivitas sebesar 8,46%. Aktivasi fitase oleh mineral masih membingungkan dan belum dapat diketahui mekanismenya karena fitase yang diisolasi dari spesies yang berbeda menunjukkan respon yang berbeda pula terhadap beberapa mineral. Sebagai contoh ion magnesium dan mangan memberikan efek sebagai aktivator fitase *Phaseolus vulgaris* (Lolas dan Markakis, 1977),

namun bagi fitase *Enterobacter* sp. 4 memberikan hal yang sebaliknya (Yoon *et al.*, 1996).

Konsentrasi 1 mM pada Fe²⁺ dan Fe³⁺ memberikan efek yang menghambat aktivitas fitase *B. coagulans*. Kedua mineral memberikan inhibisi yang cukup signifikan, yaitu terjadi penurunan aktivitas berturut-turut sebesar 20,32 dan 32,17%. Penghambatan ini karena adanya pengendapan substrat yang saling berikatan an-tara kedua mineral. Greiner *et al.* (1993) serta Lolos dan Markakis (1977) membuktikan bahwa enzim berkompetisi dengan ion besi untuk mengikat molekul fitat, ditandai dengan teramatinya endapan Fe-fitat.

KESIMPULAN

Aktivitas optimum fitase dari *B. coagulans* isolat E.1.4.4 dicapai pada suhu 40°C dan pH 6,0. Nilai konsentrasi Michaelis-Menten (K_m) pada suhu dan pH optimum berdasarkan kurva Lineweaver-Burk diperoleh 0,562 mM dengan aktivitas maksimum 0,731 μmol PO₄³⁻/menit/ml.

Mineral magnesium, mangan, dan kalsium dapat berperan sebagai aktivator bagi fitase *B. coagulans*, sedangkan Fe²⁺ dan Fe³⁺ berperan sebagai inhibitor.

DAFTAR PUSTAKA

- Cosgrove, D.J.** 1980. Inositol phosphates: Their chemistry, biochemistry, and physiology. Elsevier Scientific Publishing Company. New York.
- 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.
- 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.
- Judoamidjojo, M., A.A. Darwis, dan E.G. Said.** 1992. Teknologi Fermentasi. Rajawali Pres. Jakarta.
- Lolas, M.G. and G. Markakis.** 1977. The phytase of navy beans (*Phaseolus vulgaris*). J. Food. Sci. 42:1094-1101.
- Mikio, S.** 1992. Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77. Enzyme Microb. Technol. 56(8):1266-1269.
- Muchtadi, D.** 1998. Kajian gizi produk olahan kedelai. Dalam Nuraida, L. dan S. Yasni (Eds.). Prosiding Seminar Pengembangan Pengolahan dan Penggunaan Kedelai selain Tempe. Kerjasama Pusat Studi Pangan dan Gizi-IPB dengan American Soybean Association.

- Muntean, V. 1994.** Inhibition of phosphatase activity in a salt lake sediment, a leached chernozem, and a brown luvic soil. *Studi Universitatis Babes Bolyai*. 39:105-111.
- Nandi, S. and D. Sarkar. 1995.** Partial purification and characterization of a soluble protein phosphatase from *Leishmania donovani* promastigotes. *Molec. Cell Biochem*. 148:191-198.
- Schopes, R.K. 1987.** Protein Purification. Springer-Verlags, New York.
- Shieh, T.R. and J.H. Ware. 1968.** Survey of microorganisms for the production of extracellular phytase. *Appl. Microbiol*. 16:1348-1351.
- Stanburry, P.F. and A. Whitaker. 1984.** Principle of Fermentation Technology. Pagamon Press Ltd. Oxford.
- Tangendjaja, B. 1979.** Studies on the dephosphorilation of phytic acid in rice bran. University of New South Wales, Sydney.
- Widowati, S., Rosmimik, D. Andriani, dan D.S. Damardjati. 1998.** Optimalisasi produksi enzim fitase dari *Bacillus coagulans* pada skala laboratorium. Makalah Disampaikan pada Seminar Nasional Bioteknologi di Malang.
- Yoon, S.J., Y.J. Choi, H.K. Min, K.K. Cho, J.W. Kim, S.C. Lee, and Y.H. Jung. 1996.** Isolation and identification of phytase-producing bacterium *Enterobacter* sp. 4 and enzymatic properties of phytase enzyme. *Enzyme Microb. Technol*. 18:449-454.