

PENGUJIAN PHYTASE MENGGUNAKAN METODE MEGAZYME DAN METODE PRODUSEN

Ambarwati dan Emma Amalia
Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan
(Gunungsindur Bogor 16340)

ABSTRAK

Telah dilakukan pengujian terhadap obat hewan yang mengandung enzim phytase dengan menggunakan metode Megazyme dan metode produsen. Pengujian enzim phytase dilakukan untuk mengetahui uji kesesuaian aktivitas enzim terhadap komposisi pada label. Jumlah enzim phytase yang diuji pada tahun 2008-2009 di Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BBPMSONH) sebanyak 10 sampel dengan komposisi minimal 1.000 - 10.000 U/g. Pada pengujian menggunakan metode produsen kit Megazyme, sampel enzim phytase yang mempunyai komposisi antara 1.000 - 10.000 U/g, diperoleh hasil rata-rata 103,84 %. Sedangkan pada pengujian menggunakan metode produsen, sampel enzim phytase yang mempunyai komposisi minimal 5.000 U/g, diperoleh hasil rata-rata 104,66 %.

Kata Kunci : phytase, aktivitas enzim

ABSTRACT

Assay of veterinary drugs containing phytase enzyme has been carried out using megazyme method and producer method. Purpose of this test is to know the accuracy of enzyme activity based on the label. There were 10 samples had been tested during 2008-2009 at National Veterinary Drug Assay Laboratory which contained 1,000 until 10,000 U/g based on their minimal composition. Using method of Megazyme kit producer, the tested samples which has 1,000 - 10,000 U/g in their composition was found the result 103.84%. The other hand, using the producer method, the samples which had 5,000 U/g phytase enzyme in minimal composition, delivered result 104.66 %.

Key Word : phytase, enzyme activity

PENDAHULUAN

Perkembangan lingkup obat hewan semakin meningkat dari tahun ke tahun, terutama golongan premiks. Golongan ini merupakan suatu produk yang dicampurkan ke dalam pakan hewan dengan tujuan untuk membantu meningkatkan fungsi-fungsi fisiologis dalam tubuh (1,5). Salah satu golongan premiks yang sangat diperlukan dalam pakan ternak adalah enzim phytase.

Belakangan enzim mulai dipergunakan secara luas untuk tujuan industri dengan mempertimbangkan keuntungan yang nyata dibandingkan apabila metoda *processing* dilakukan dengan cara kimia maupun fisika. Enzim akan bekerja optimal pada kondisi menengah misalnya pada suhu moderat dan kisaran pH yang luas (2,5).

Keuntungan lain adalah bahwa enzim bersifat tidak beracun, alami dan segera menjadi tidak aktif apabila reaksi sudah mencapai titik yang dikehendaki. Salah satu cara untuk menjawab tantangan diatas adalah menambahkan enzim phytase yang mempunyai kemampuan tinggi dalam mendegradasi asam phytat melebihi aktivitas phytase yang telah ditemukan selama ini. Aplikasi enzim phytase melalui suplementasi pada

pakan akan meningkatkan efisiensi pakan dan untuk meningkatkan kesehatan hewan (3,4).

Selama tahun 2008-2009 terdapat peningkatan jumlah sampel enzim phytase yang masuk ke BBPMSONH menjadi 10 sampel. Dengan meningkatnya jumlah tersebut, maka dibutuhkan suatu metode pengujian yang dapat memenuhi persyaratan mutu yang sesuai dengan standar. Sedangkan metode pengujian enzim phytase belum banyak dibahas dalam metode pengujian yang diakui. Tujuan studi ini adalah mengkaji metode uji agar aktivitas enzim phytase dalam sediaan obat jadi dengan berbagai komposisi dapat diketahui dan diperoleh kesesuaian aktivitas enzim phytase terhadap aktivitas yang tertera pada label.

MATERI DAN METODE

1. Metoda Megazyme

Bahan

Bahan-bahan yang diperlukan meliputi kit Megazyme, asam askorbat, asam sulfat, amonium molibdat, *trichloroacetic acid* (TCA), asam klorida (HCl) dan natrium hidroksida (NaOH).

Prosedur Pengujian

Sejumlah sampel dilarutkan dalam 20 mL HCl 0,66 M dan diaduk selama minimum 3 jam dalam temperatur ruang. Ekstrak diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung kemudian disentrifus dengan kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil sebanyak 0,5 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi untuk dinetralkan dengan menambahkan 0,5 mL larutan NaOH 0,75 M.

Dua tabung reaksi disiapkan sebagai *free phosphor* (*free P*) dan *total phosphor* (*total P*). Masing-masing tabung diisi dengan air suling sebanyak 0,62 mL (*free P*) dan 0,60 mL (*total P*). Kemudian ditambahkan 0,20 mL Kit I dan 0,05 mL ekstrak sampel pada kedua tabung. Pada tabung total P ditambahkan 0,02 mL Kit II. Semua tabung dicampur hingga homogen dengan *vortex mixer* dan diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 40°C selama 10 menit. Pada tabung *free P* ditambahkan 0,02 mL air suling. Selanjutnya ditambahkan 0,20 mL Kit III pada kedua tabung. Pada tabung total P ditambahkan Kit IV. Semua tabung dicampur hingga homogen dengan *vortex mixer* dan diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 40°C selama 15 menit. Proses reaksi dalam kedua tabung dihentikan dengan menambahkan 0,30 mL TCA 50%. Kedua tabung disentrifus dengan kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dari masing-masing tabung diambil sebanyak 1,0 mL, dimasukkan ke dalam tabung reaksi baru dan ditambahkan 0,5 mL pereaksi warna. Kedua tabung dicampur hingga homogen dengan *vortex mixer* dan diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 40°C selama 60 menit. Sambil menunggu inkubasi, kurva standar fosfor dibuat dengan menggunakan Kit V. Pengukuran serapan dilakukan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 655 nm. Aktivitas enzim dihitung dengan persamaan rumus sebagai berikut:

$$C = \frac{\text{Mean (M)} \times 20 \times F}{10.000 \times 1,0 \times 10} \times \text{AA Phosphor}$$

Keterangan :

- C : aktivitas enzim
- Mean M : nilai rata-rata dari standar fosfor
- F : faktor pengenceran
- AA : selisih serapan dari sampel
- 10000 : faktor konversi dari mikro g/g ke g/100 g
- V : volume sampel (mL.)
- 1,0 : berat sampel (g)

2. Metode Produsen

Bahan

Bahan-bahan yang diperlukan meliputi natrium asetat trihidrat, triton X-100, Bovine Serum Albumine (BSA), natrium phytase, asam nitrat, amonium molibdat, amonia 25%, amonium vanadat, standar phytase dan kalium bifosfat.

Bufet asetat I (0,25 mol/L) dibuat dengan cara melarutkan 34,02 g natrium asetat trihidrat ke dalam 900 mL air suling, pH diatur menjadi 5,00-0,01 (dengan 0,1 N HCl) dan volume dibuat menjadi 1000 mL. Bufet disimpan dalam suhu ruang. Bufet asetat II (0,25 mol/L) dengan melarutkan 34,02 g natrium asetat trihidrat, 0,5 g triton X-100 dan 0,5 g BSA ke dalam 900 mL air suling, pH diatur menjadi 5,50±0,01 (dengan 0,1 N HCl) dan volume dibuat menjadi 1000 mL. Bufet disimpan dalam suhu ruang. Larutan natrium phytase (7,5 mmol/L) dibuat dengan cara melarutkan 0,6929 g natrium phytase ke dalam bufet asetat I dan volume dibuat menjadi 100 mL dengan air suling. Larutan asam nitrat dibuat dengan cara mencampur asam nitrat dan air suling dengan perbandingan 1 : 2. Larutan amonium molibdat (100 g/L) dibuat dengan cara melarutkan 10 g amonium molibdat dan 1 mL amonia 25% dalam 100 mL air suling. Larutan amonium vanadat (2,35 g/L) dibuat dengan cara melarutkan 0,235 g amonium vanadat dan 2 mL asam nitrat dengan 100 mL air suling dalam labu ukur coklat. Pereaksi warna dibuat dengan cara mencampurkan amonium molibdat dan amonium vanadat dengan perbandingan 2 : 1.

Prosedur Persiapan Standar

Kalium dihidrogen fosfat sebanyak 0,680 g dilarutkan dengan 100 mL bufet asetat II (konsentrasi larutan induk 50 mmol/L). Dibuat pengenceran bertingkat dari standar kalium dihidrogen fosfat yang dilarutkan dengan bufet asetat untuk kestabilan persamaan regresi $y = ax + b$, (sumbu y = *inorganic phosphorus* dan sumbu x = OD). Pengenceran I dibuat dengan memipet 0,5 mL larutan induk dan dilarutkan dalam 0,5 mL bufet asetat II (konsentrasi 20 mmol/L). Pengenceran II dibuat dengan memipet 0,5 mL larutan induk dan dilarutkan dalam 1,5 mL bufet asetat II (konsentrasi 12,5 mmol/L). Pengenceran III dibuat dengan memipet 0,5 mL larutan induk dan dilarutkan dalam 3,5 mL bufet asetat II (konsentrasi 6,25 mmol/L). Pengenceran IV dibuat dengan memipet 0,5 mL larutan induk dan dilarutkan dalam 7,5 mL bufet asetat II (konsentrasi 3,125 mmol/L). Pengenceran V dibuat dengan memipet 0,5 mL larutan induk dan dilarutkan dalam 15,5 mL bufet asetat II (konsentrasi 1,5625 mmol/L).

Prosedur Persiapan Sampel

Ditimbang sejumlah sampel dengan melarutkan dalam 70 mL bufet asetat II. Larutan diaduk selama 30 menit dan dibuat menjadi 100 mL. Larutan disentrifus dengan kecepatan 400 rpm/menit selama 10 menit. Supernatan diambil dan diencerkan dengan bufet asetat II (konsentrasi 0,4 U/mL). Disiapkan tabung 10 mL untuk 5 pengenceran standar, sampel dan blanko. Pada masing-masing tabung ditambahkan 1,8 mL bufet asetat I dan 0,2 mL larutan uji. Semua larutan dicampur hingga homogen dengan *vortex mixer* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Ditambahkan 4 mL larutan natrium

phytase ke semua tabung, dicampur dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Pereaksi warna ditambahkan sebanyak 4 ml, dan dicampur hingga homogen dengan *vortex mixer*. Jumlah total larutan adalah 10 ml. Semua larutan didiamkan selama 10 menit pada suhu ruang. Bila larutan sampel masih keruh, larutan disentrifus dengan kecepatan 4000 rpm/menit selama 10 menit. Pengukuran serapan dilakukan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 415 nm. Aktivitas enzim dihitung dengan persamaan rumus sebagai berikut :

$$U = \frac{C \times F}{S \times M \times 30}$$

Keterangan :

U : aktivitas phytase

C : aktivitas dihitung dengan persamaan regresi linier

F : total waktu pengenceran terhadap reaksi

S : volume sampel

M : berat sampel (g)

30 : waktu reaksi (menit)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengujian dilakukan terhadap 10 sampel obat hewan mengandung enzim phytase dengan menggunakan 2 metode yaitu metode Megazyme dan metode produsen, masing-masing menggunakan 5 sampel. Pada Tabel 1 menunjukkan bahwa pengujian menggunakan metode produsen kit Megazyme, sampel enzim phytase yang mempunyai komposisi antara 1.000 - 10.000 U/g, diperoleh hasil rata-rata 103,84%.

Tabel 1. Hasil pengujian dengan menggunakan metode produsen kit Megazyme

Kode Sampel	Komposisi minimal (U/g)	Hasil Aktivitas (U/g)	Hasil Presentase (%)
A	1.000	1.099	109,90
B	5.000	5.250	105,00
C	10.000	10.350	103,50
D	10.000	10.050	100,50
E	2.500	2.507	100,28
Rata-rata			103,84

Sedangkan pada Tabel 2 menunjukkan bahwa pengujian menggunakan metode produsen, sampel obat hewan mengandung enzim phytase yang mempunyai komposisi minimal 5.000 U/g diperoleh hasil rata-rata 104,66%.

Tabel 2. Hasil pengujian dengan menggunakan metode produsen

Kode Sampel	Komposisi minimal (U/g)	Hasil Aktivitas (U/g)	Hasil Presentase (%)
F	5.000	5.422	108,44
G	5.000	5.560	107,20
H	5.000	5.233	104,66
I	5.000	5.100	102,00
J	5.000	5.051	101,02
Rata-rata			104,66

Pada pengujian dengan metode Megazyme diperoleh hasil berkisar antara 100,28% - 109,90% dengan rata-rata 103,84%. Sedangkan dengan metode produsen diperoleh hasil berkisar antara 101,02% - 108,44% dengan rata-rata 104,66%. Hasil pengujian ini menunjukkan bahwa aktivitas enzim phytase baik yang diuji menggunakan metode Megazyme maupun metode produsen, memberikan hasil sesuai standar minimal (90 - 110%) dari yang tertera pada label dan memenuhi persyaratan pengujian obat hewan (FOHI).

KESIMPULAN

Dari hasil pengujian obat hewan mengandung enzim phytase dalam obat hewan menggunakan metode megazyme (103,84%) dan metode produsen (104,66%) tidak berbeda nyata, sehingga kedua metode tersebut dapat digunakan untuk pengujian enzim phytase.

DAFTAR PUSTAKA

1. Anonim. 2007. Phytic Acid (Phytate) / Total Phosphorus, Assay Prosedur, Megazyme International Ireland Ltd., Ireland.
2. Anonim. diakses tgl 30 maret 2010. Indonesian Web Site Agribisnis information dari http://suharjawanasureia.tripod.com/teknologi_pakan_enzyme.htm.
3. Katzung, B.G. 2001. Basic and Clinical Pharmacology, 8th Edition, McGraw-Hill Companies Inc.USA.
4. Pugh, R. and Chalfont D. 1993. The Scope for Enzymes in Commercial Feed Formulations, In Asia Pacific Lecture, Alltech .
5. Riyadi, W. 2009. Efisiensi Pakan Ternak dengan Phytase. <http://sciencebiotech.net/efisiensi-pakan-ternak-dengan-phytase/>.