

ISOLASI DAN PURIFIKASI FITASE DARI BAKTERI ENDOFIT ASAL TANAMAN JAGUNG (*Zea mays*).



Skripsi

Diajukan untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Meraih Gelar Sarjana Sains
Jurusan Biologi pada Fakultas Sains dan Teknologi
UIN Alauddin Makassar

Oleh:

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
HUSNUL HATIMAH
60300113069
ALAUDDIN
MAKASSAR

FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UIN ALAUDDIN MAKASSAR

2017

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

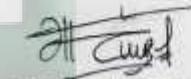
Mahasiswa yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Husnul Hatimah
NIM : 60300113069
Tempat / Tgl. Lahir : Pangkajene / 18 Januari 1996
Jur/Prodi : Biologi/S1
Fakultas : Sains dan Teknologi
Alamat : Kompleks Hasanuddin Pandang-pandang Jl. Melati Blok C.
49, Sungguminasa-Gowa
Judul : Isolasi dan Purifikasi Fitase dari Bakteri Endofit Asal
Tanaman Jagung (*Zea mays*)”.

Menyatakan dengan sesungguhnya dan penuh kesadaran bahwa skripsi ini benar adalah hasil karya sendiri. Jika di kemudian hari terbukti bahwa ia merupakan duplikat, tiruan, plagiat, atau dibuat oleh orang lain, sebagian atau seluruhnya, maka skripsi dan gelar yang diperoleh karenanya batal demi hukum.

Makassar, 28 Agustus 2017

Penyusun



Husnul Hatimah

NIM: 60300113069

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI

ALAUDDIN

M A K A S S A R

PENGESAHAN SKRIPSI

Skripsi yang berjudul “**Isolasi dan Purifikasi Fitase dari Bakteri Endofit Asal Tanaman Jagung (*Zea mays*)**”, yang disusun oleh Husnul Hatimah, NIM: 60300113069, mahasiswa Jurusan Biologi pada Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin Makassar, telah diuji dan dipertahankan dalam sidang *munaqasyah* yang diselenggarakan pada hari Jumat, 25 Agustus 2017, dinyatakan telah dapat diterima sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana dalam Ilmu Sains dan Teknologi, Jurusan Biologi.

Makassar, 28 Agustus 2017 M
06 Dzulhijah 1438 H

DEWAN PENGUJI :

Ketua	: Prof. Dr. H. Arifuddin, M.Ag.	(.....)
Sekretaris	: Hasyimuddin, S.Si., M.Si.	(.....)
Munaqisy I	: Isna Rasdianah, Aziz S.Si., M.Sc.	(.....)
Munaqisy II	: Eka Sukmawaty, S.Si., M.Si.	(.....)
Munaqisy III	: Dr. Aan Farhani, M.Ag.	(.....)
Pembimbing I	: Hafsan, S.Si., M.Pd.	(.....)
Pembimbing II	: Dr. Mashuri Masri. S.Si., M.Kes.	(.....)

Diketahui oleh:

Dekan Fakultas Sains dan Teknologi
UIN Alauddin Makassar,



Prof. Dr. H. Arifuddin, M.Ag.
NIP. 19710412 200003 1 001

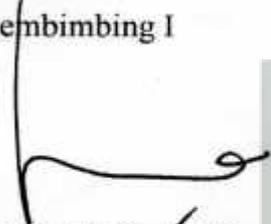
PERSETUJUAN PEMBIMBING

Pembimbing penulisan skripsi saudara **Husnul Hatimah**, NIM: 60300113069, mahasiswa Jurusan Biologi pada Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin Makassar, setelah meneliti dan mengoreksi dengan seksama skripsi yang berjudul "**Isolasi dan Purifikasi fitase dari bakteri endofit asal tanaman Jagung (*Zea mays*)**", memandang bahwa skripsi tersebut telah memenuhi syarat-syarat ilmiah dan dapat disetujui untuk diajukan ke sidang munaqasyah.

Demikian persetujuan ini diberikan untuk diproses lebih lanjut.

Makassar, 28 Agustus 2017

Pembimbing I


Hafsan S.Si., M.Pd
NIP. 19810912 200912 2 008

Pembimbing II


Dr. Mashuri Masri S.Si., M.Kes.
NIP. 19801216 2009912 1 008

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
ALAUDDIN
M A K A S S A R

KATA PENGANTAR

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Pertama-tama segala puji bagi Allah, Tuhan seluruh alam yang Maha pengasih lagi Maha penyayang atas limpahan rahmat, nikmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Isolasi dan Purifikasi fitase dari bakteri endofit asal tanaman jagung (*zea mays*)”. Tak lupa lupa Sholawat dan salam semoga senantiasa tercurahkan kepada Rasulullah Muhammad shallallahu alaihi wasallam dan para sahabatnya, yang telah memberikan tauladan baik, semoga kita termasuk umatnya yang kelak mendapatkan syafa’at dalam menuntut ilmu.

Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Alauddin Makassar. Penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari hambatan dan tantangan, namun berkat kerja keras, bimbingan dan motivasi dari berbagai pihak sehingga dapat terselesaikan dengan baik. Terimah kasih yang sebesar-besarnya kepada kedua orang tua tercinta Ayahanda Muh.Saleh.L dan Ibunda St.Arfaah atas doa dan dukungan morilnya. Pada kesempatan ini penulis mengucapkan banyak terima kasih secara mendalam kepada semua yang membantu dalam penyelesaian skripsi ini diantaranya :

1. Prof. Dr. H. Musafir Pababbari, M.Ag., selaku Rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Alauddin Makassar serta sejawarannya.
2. Prof. Dr. A.Qadir Gassing HT.,MS., selaku Rektor periode 2011-2015 Universitas Islam Negeri (UIN) Alauddin Makassar.
3. Prof. Dr. H. Arifuddin Ahmad, M.Ag., selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Alauddin Makassar dan sejawarannya.
4. Dr. Mashuri Masri, S.Si., M.Kes., selaku Ketua Jurusan Biologi Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin Makassar.

5. Baiq Farhatul Wahidah, S.Si., M.Si., selaku Sekretaris Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin Makassar.
6. Hafsan, S.Si., M.Pd sebagai Dosen Pembimbing I dan Dr. Mashuri Masri, S.Si., M.Kes sebagai Dosen Pembimbing II yang sabar memberikan bimbingan, arahan, masukan, dan telah meluangkan waktu membimbing penulis sehingga skripsi ini dapat terselesaikan, *Jazaakumallahu khairan* ☺
7. Isna Rasdianah S.Si., M.Sc., Eka Sukmawaty S.Si., M.Si., dan Dr. Aan Farhani M.Ag. selaku Dosen Penguji yang telah banyak memberikan masukan yang sangat bermanfaat bagi penelitian dan penulisan skripsi penulis, *Jazaakumullahu khairan* ☺
8. Seluruh Bapak/Ibu Dosen Pengajar yang selama ini telah mengajarkan banyak hal serta pengetahuan yang berlimpah selama kuliah di kampus ini serta seluruh Staf Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin Makassar.
9. Kepala Laboratorium dan seluruh Laboran Jurusan Biologi FST UIN Alauddin Makassar yang memberikan ilmu, arahan, dan membantu selama penelitian ini.
10. Spesial saudaraku Nurul Hikmah, Muh. Ishak Ramadhan dan Putri nurul Fadillah *thanks for everything, ,love you more than you know~*
11. Spesial *for my beloved cousin* Wiwi widya lestari, *my bestfriend* Muftihatul rahmah, *thankyou guys* atas motivasi yang tak henti-hentinya dalam penyusunan skripsi ini.
12. Spesial untuk *the best team ever!* “*PHYTASE TEAM*” (Yuniar Harvianti, Ety Kurnia Febryanti, Nurhikma, dan Maslan) suka dan duka hidup sebagai mahasiswa kita rasakan bersama dan selalu setia menemani mencari solusi-solusi dikala penat melanda *syukran, wa Jazakumullahu khairan* ☺
13. Sahabat-sahabat dan Teman-teman sejawad jurusan biologi sains angkatan 2013 “13RACHIALIS” yang telah memberikan dukungan dan motivasi serta banyak kenangan yang tak terlupakan selama ini, *see you on top guys*.
14. Adik-adik angkatan 2014, 2015, dan 2016 terimakasih atas dukungan dan doanya selama ini.

15. Teman-teman KKN Cikoro, Kec. Tombobulu, Kab.Gowa terima kasih kenangannya mengerjakan proposal di posko KKN serta berbagi materi multidisiplin ilmu.
16. Serta seluruh pihak terkait yang membantu proses penyelesaian skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu *syukran* atas doa, semangat, dukungan, saran dan pemikiran yang diberikan kepada penulis.

Dalam penulisan skripsi ini, penulis menyadari sepenuhnya bahwa masih banyak kekurangan-kekurangan dan masih jauh dari kesempurnaan karena sayapun manusia biasa yang tak luput dari kesalahan, maka penulis mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun dari semua pihak. Dengan skripsi ini, semoga dapat menambah wawasan dan memberikan bermanfaat bagi penulis dan pembaca pada umumnya . Semoga kita semua termasuk orang-orang yang senantiasa beristiqamah dalam menuntut ilmu pengetahuan tetapi tetap berpedoman denan al-Qur'an dan as-sunnah. Semoga Allah memudahkan jalan kita menuju syurgaNya Aamiin ☺ karena ada hadist dari nabi Muhammad shallallahu'alaihi wasallam yang berbunyi Barang siapa yang menempuh sebuah jalan untuk menuntut ilmu, Allah akan mudahkan jalannya menuju syurga (HR. Muslim). Barakallahu Fiikum ☺



Makassar, Agustus 2017

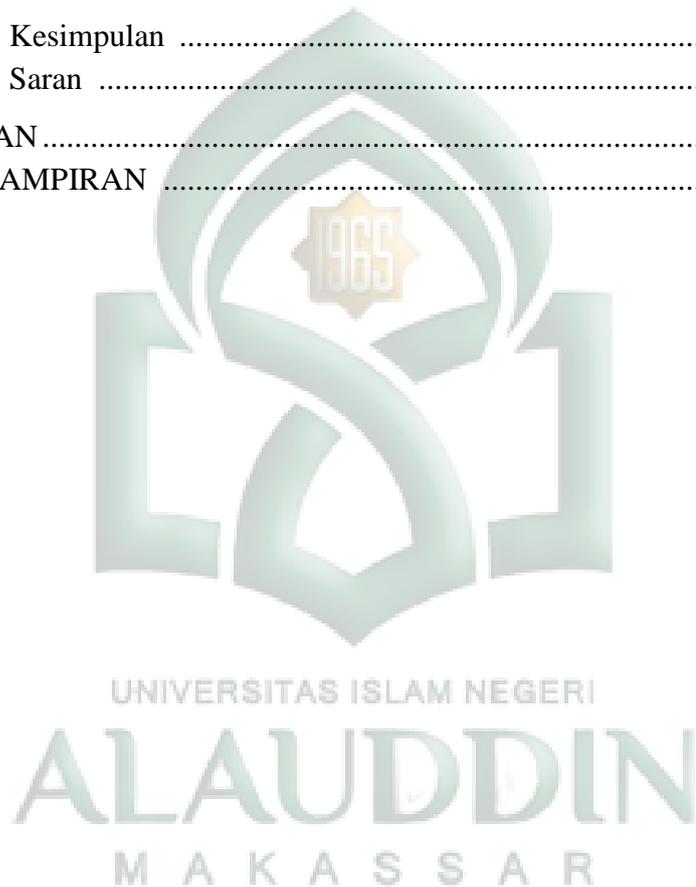
Penulis

Husnul Hatimah
NIM: 60300113069

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL.....	i
KATA PENGANTAR	ii-iv
DAFTAR ISI	v-vi
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN.....	ix
ABSTRAK	x
ABSTRACT	xi
BAB I PENDAHULUAN	1-13
A. Latar Belakang.....	1-8
B. Rumusan Masalah.....	9
C. Ruang Lingkup Penelitian.....	9-10
D. Kajian Pustaka	10-12
E. Tujuan Penelitian	12
F. Kegunaan Penelitian	13
BAB II TINJAUAN TEORITIS	14-41
A. Ayat yang Relevan.....	14
B. Tinjauan Enzim.....	17
C. Cara kerja enzim dan faktor-faktor yang mempengaruhinya...	20
D. Klasifikasi enzim	22
E. Asam fitat.....	23
F. Fitase	27
G. Karakteristik enzim fitase	29
H. Pemurnian enzim	30
I. Kerangka Pikir	41
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	42-50
A. Jenis dan Pendekatan Penelitian	42
B. Waktu dan Lokasi penelitian	42
C. Variabel Penelitian.....	42
D. Definisi Operasional Variabel.....	42
E. Instrumen Penelitian (alat dan bahan).....	43

F. Prosedur Kerja	44
G. Teknik Pengolahan.....	49
H. Skema kerja	50
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	51-63
A. Hasil Penelitian	51
B. Pembahasan	55
BAB V PENUTUP	64
A. Kesimpulan	64
B. Saran	65
KEPUSTAKAAN.....	66-71
LAMPIRAN-LAMPIRAN	72-97



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	tipe-tipe sephadeks.....	35
Tabel 2.2	Tingkat kemurnian produk fermentasi pada berbagai proses pemisahan	49
Tabel 4.1	kadar protein <i>Crude enzyme</i>	51
Tabel 4.2	Aktivitas <i>Crude enzyme</i>	51
Tabel 4.3	Kadar protein tiap fraksi pengendapan Amonium Sulfat.....	52
Tabel 4.4	Aktivitas enzim fraksi pengendapan Amonium Sulfat	52
Tabel 4.5	Kadar protein tiap fraksi pengendapan Amonium Sulfat setelah Dialisis	53
Tabel 4.6	Aktivitas enzim tiap fraksi pengendapan Amonium Sulfat setelah Dialisis	53
Tabel 4.7	Nilai Aktivitas dan Kadar Protein tiap Fraksi pemurnian Kromatografi Filtrasi Gel Sephadex G-100	54
Tabel 4.8	Tingkat Kemurnian Fitase dari Bakteri <i>Burkholderia Lata</i> strain 383 Menggunakan Filtrasi gel sephadeks G-100 dibandingkan ekstrak kasar enzim.....	55

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Teori kunci-gembok.....	21
Gambar 2.2.	Teori kecocokan induksi.....	21
Gambar 2.3.	Struktur asam fitat.....	25
Gambar 2.4.	Hidrolisis Asam fitat Oleh sumber fitase.....	31



ABSTRAK

Nama : Husnul Hatimah
NIM : 603001113069
Judul Skripsi : “Isolasi dan Purifikasi Fitase dari bakteri endofit asal tanaman jagung (*Zea mays*)”.

Telah dilakukan pemurnian enzim fitase dari bakteri *Burkholderia lata* strain 383 endofit asal tanaman jagung (*Zea mays*). Pemurnian fitase dalam penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahapan, yaitu: 1) Isolasi ekstrak kasar enzim (*Crude enzym*) dengan sentrifugasi, 2) Pra pemurnian yaitu Fraksinasi amonium sulfat, 3) dialisis dengan membran selofan, dan 4) Pemurnian lebih lanjut menggunakan kromatografi filtrasi gel matriks G-100. Penentuan kadar protein menggunakan metode Bradford dan analisis aktivitas enzim merupakan penentuan jumlah enzim yang mengkatalisis pembentukan fosfat inorganik. Hasil pemurnian fitase dari bakteri *Burkholderia lata* strain 383 endofit asal tanaman jagung (*Zea mays*) setelah menggunakan kromatografi filtrasi gel dengan matriks sephadeks G-100 diperoleh fraksi terbaik yaitu F9 dengan aktivitas spesifik enzim 0,3 U/mg dengan tingkat kemurnian 3 kali lipat dari ekstrak kasar enzim (*Crude enzyme*).

Kata Kunci: Pemurnian, fitase, *Burkholderia lata*, dan Kromatografi filtrasi gel G-100.



ABSTRACT

Name : Husnul Hatimah
NIM : 60300113069
Skripsi Title : “Isolation and Purification of phytase from endophyte bacterial source maize (*Zea mays*)”

Phytase from *Burkholderia lata* strain 383 endophyte bacterial source (*Zea mays*) was purified. Purification of Phytase in this research has done in several stages, 1) Isolation of the Crude enzyme by centrifugation, 2) Pre of purification (amonium sulfate precipitation), 3) dialysis with cellophane membrane, and 4) the further Purification using gel filtration chromatography on sephadex G-100 column. Determine of protein concentration by using Bradford method, Phytase enzyme assay was determined by calculating the amount of liberated inorganic phosphate. The result of the purification that has been done after using gel filtration chromatography *sephadex* G-100 column shows that, the best fraction namely F9 with specific activity 0,3 U/mg with a enzyme purity level (F9) 3 fold compared with crude enzyme.

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
ALAUDDIN
M A K A S S A R

Keynote: purification, phytase, *Burkholderia lata*, and gel filtration Chromatography sephadex G-100 column.

BAB I

PENDAHULUAN

A. *Latar Belakang*

Nabi Muhammad saw. datang membawa kebenaran ilmiah di tengah bangsa arab yang terbelakang dan tak berilmu. Empat belas abad kemudian, riset ilmiah dan penemuan medis mengungkapkan kebenaran islam. Padahal, al-Qur'an tidak diturunkan sebagai kitab ilmu kedokteran, ilmu falak (astronomi) atau ilmu lainnya. Namun, para ilmuwan di berbagai bidang berhasil menyingkap mukjizat ilmiah al-Qur'an (Thayyarah, 2014).

Kemukjizatan al-Qur'an tampak jelas dalam keindahan aspek bahasa dan sastranya, pemberitaannya tentang umat terdahulu maupun peristiwa masa depan, serta hikmah dibalik syariat ditetapkannya. Kini, perbincangan seputar mukjizat ilmiah al-Qur'an kian penting seiring dengan perkembangan pesat ilmu pengetahuan (Thayyarah, 2014).

Allah swt. telah menggoreskan firmanNya secara tegas dan tersirat mengenai langit dan bumi beserta isinya di dalam al-Qur'an, tergantung dari kita hambanya bagaimana mengkaji dan menelaah lebih dalam apa yang telah Allah jelaskan, karena sesungguhnya al-Qur'an mempunyai fungsi dan peranan penting dari berbagai sisi kehidupan yang terus berkembang mulai dari zaman dahulu sampai zaman dengan tingkat kecanggihan teknologi yang luar biasa ini, hingga akhir zaman nanti.

Alam menjadi kajian dan pembahasan yang menarik bagi para ilmuwan dan dalam perjalanan perkembangan zaman. Perkembangan ilmu pengetahuan tidak akan berhenti walau hanya sesaat. Setiap hari, penemuan baru yang menakjubkan terus bermunculan. Fenomena ini membuat seorang mukmin kian bertambah keimanannya. Fakta ilmiah dalam al-Qur'an yang banyak ditemukan oleh para ilmuwan bukanlah pembenaran ayat-ayat al-Qur'an, melainkan penegasan bahwa keselarasan al-Qur'an dengan sains modern adalah niscaya (Thayyarah, 2014).

Sebagai ilmuwan muslim, sudah sepatutnya kita menempatkan al-Qur'an sebagai sumber juga sebagai paradigma kerangka berpikir dalam mengembangkan ilmu pengetahuan seperti melakukan riset atau penelitian dengan menggali, mencari dan memahami berbagai rahasia alam dan ilmu pengetahuan yang tersimpan dalam al-Qur'an.

Salah satu objek biologi yang menarik untuk diteliti dan dikaji lebih lanjut adalah bakteri, karena bakteri juga merupakan makhluk hidup ciptaan-Nya. Semua yang diciptakan oleh Allah swt. pasti ada tujuannya, dalam konteks pemanfaatannya, Allah swt. berfirman dalam QS. Al-Anbiya'/21:16

وَمَا خَلَقْنَا السَّمَاءَ وَالْأَرْضَ وَمَا بَيْنَهُمَا لَعِبِينَ ﴿١٦﴾

Terjemahnya:

dan tidaklah Kami ciptakan langit dan bumi dan segala yang ada di antara keduanya dengan bermain-main (Kementerian Agama RI, 2009).

Menurut M.Quraish Shihab (2002) dalam kitabnya tafsir al-misbah menjelaskan bahwa: tidak wajar bagi Kami melakukan selain apa yang telah Kami

lakukan itu, yakni menepati janji Kami dan menyiksa para pembangkang, karena *tidaklah kami ciptakan langit dan bumi dan segala yang ada di antara keduanya dengan tata aturan yang demikian rapi, indah dan harmonis dengan bermain-main*, yakni tanpa arah dan tujuan yang benar, tetapi itu semua Kami ciptakan untuk membuktikan keesaan dan kekuasaan Kami serta untuk kepentingan makhluk-makhluk Kami (Shihab, 2002).

Ayat tersebut menjadi pedoman dan acuan penulis dalam melakukan penelitian ini untuk mengembangkan ilmu sains modern yang berlandaskan al-Qur'an serta memberikan penegasan bahwa keselarasan al-Qur'an dengan bidang keilmuan khususnya biologi adalah niscaya. Ayat tersebut telah menegaskan bahwa tidak diciptakan langit dan bumi beserta isinya dengan bermain-main atau tiada gunanya, segala sesuatu yang diciptakan oleh Allah swt. itu mempunyai hikmah, manfaat dan tujuan yang benar begitu pula dengan diciptakannya bakteri yang dapat mensintesis enzim fitase.

Sebagai makhluk ciptaan Allah yang dikaruniai akal dan pikiran, sudah sepatutnya kita memuji dan bertasbih kepada-Nya karena begitu banyak keajaiban yang menunjukkan kekuasaan Allah melalui ciptaan-Nya, bahkan bakteri sekalipun yang berukuran mikro, tidak dapat dilihat tanpa menggunakan bantuan mikroskop mempunyai manfaat, salah satunya bakteri yaitu bakteri penghasil fitase yang dapat memproduksi enzim fitase.

Jenis bakteri sangat melimpah jumlahnya di alam, ada yang bersifat patogen adapula memberikan sejuta manfaat yang dapat diaplikasikan dalam berbagai bidang,

tergantung manusia bagaimana mengolahnya. Salah satu jenis mikroorganisme yang dimanfaatkan dalam industri pakan ternak adalah bakteri penghasil enzim fitase.

Mikroorganisme antara lain bakteri, sebagai salah satu penghasil enzim yang potensial menjadi faktor penting dalam produksi enzim (Santoso, 2013). Bakteri endofit adalah bakteri yang berada di jaringan internal tanaman, yang keberadaannya tidak menimbulkan gangguan pada tanaman tersebut (Hallman 1997 dalam Saylendra 2013). Bakteri endofit dapat diisolasi mulai dari bagian akar, batang, daun dan biji (Tarabily *et al.* 2003 dalam Saylendra 2013). Peranan dari bakteri endofit ini juga bermacam-macam. Salah satu indikator untuk mengetahui kegunaan dari bakteri endofit adalah melihat karakter fisiologisnya. Beberapa karakter fisiologis yang dapat digunakan adalah menghasilkan hormon pertumbuhan, menghasilkan enzim ekstraseluler, pelarut fosfat dan aktifitas fluoresensi (Munif 2001 dalam Saylendra 2013). Saat ini, ada banyak laporan menunjukkan endofit sebagai sumber produk alami terbaru yang menghasilkan bioaktif dan enzim (Nangklow, 2014 dalam Sahar 2015).

Enzim adalah biopolimer yang sebagian besar molekulnya berupa protein. Enzim berperan sebagai katalis dalam reaksi-reaksi biokimia yang terjadi di dalam sel makhluk hidup atau disebut pula biokatalisator yang dalam menguraikan substratnya dengan sangat spesifik. Oleh karena sifatnya tersebut dan tanpa efek samping, enzim telah banyak dimanfaatkan di luar tubuh dalam skala industri. Produk yang dihasilkannya sangat spesifik sehingga dapat diperhitungkan dengan mudah (Masri, 2014).

Enzim menjadi primadona industri saat ini dan di masa yang akan datang karena melalui penggunaannya, energi dapat dihemat serta akrab dengan lingkungan. Saat ini penggunaan enzim dalam industri makanan dan minuman, industri tekstil, industri kulit dan kertas di Indonesia semakin meningkat (Septiningrum dkk, 2008 dalam Masri, 2014). Salah satu manfaat penggunaan enzim dalam industri pakan ternak adalah sebagai nutrisi yang dapat meningkatkan produktivitas hewan ternak, dengan demikian dapat memperbaiki nilai nutrisinya. Enzim yang dimanfaatkan dalam industri pakan ternak unggas adalah enzim fitase dapat menghidrolisis asam fitat.

Asam fitat merupakan bentuk utama penyimpanan mineral fosfor di dalam tanaman, sekitar 60%-90% total mineral fosfor tersimpan dalam bentuk asam fitat. Tanaman golongan sereal, biji-bijian dan kacang-kacangan selain merupakan sumber pangan yang penting bagi kehidupan karena mengandung karbohidrat, protein nabati, mineral dan vitamin yang sangat dibutuhkan oleh makhluk hidup juga mengandung senyawa asam fitat yang cukup tinggi (Greiner, 2006 dalam Kusumadjaja, 2009).

Asam fitat dapat berikatan dengan ion mineral penting membentuk senyawa kompleks yang tidak larut sehingga menghambat absorpsi maupun ketersediaan mineral-mineral di dalam tubuh. Asam fitat juga membentuk kompleks dengan asam amino maupun protein sehingga menurunkan daya cerna serta menghambat fungsi biokimiawi. Disamping itu, asam fitat merupakan inhibitor enzim-enzim pencernaan seperti pepsin, tripsin, lipase dan amilase (Sari, 2012). Asam fitat yang

tidak tercerna secara sempurna dalam sistem pencernaan hewan ternak ini, akan akan terekskresi ke lingkungan melalui kotorannya yang dapat menimbulkan masalah lingkungan. Gugus fosfat yang terakumulasi pada lingkungan menyebabkan terjadinya eutrofikasi pada ekosistem perairan (Boyce, 2004). Dengan demikian, untuk mengatasi masalah defisiensi nutrisi dan lingkungan yang diakibatkan oleh asam fitat, dapat dilakukan dengan penggunaan enzim fitase dalam proses pembuatan pakan ternak.

Penggunaan fitase pada industri pakan ternak bertujuan untuk meningkatkan ketersediaan fosfor, mineral-mineral penting seperti K, Ca, Mg, Fe, Zn, Cu, Mn dan dalam upaya membatasi ekskresi fosfor ke lingkungan. Beberapa penelitian telah memperlihatkan bahwa penggunaan fitase pada pakan ternak dapat menggantikan suplemen fosfat anorganik dan mengurangi ekskresi fosfor sebesar 50% (Kim *et al.*, 2006). Serta terbukti mampu meningkatkan pertambahan berat tubuh rata-rata per hari hewan ternak (Kusumadjaja, 2009).

Selama dua puluh tahun terakhir, enzim fitase sangat menarik perhatian ilmuwan dan wirausahawan dalam bidang nutrisi, lingkungan, dan bioteknologi (El-Toukhy *et.al* 2013). Fitase (*myo-Inositol hexakisphosphate phosphohydrolase*) adalah enzim yang mengkatalis pelepasan fosfat dari asam fitat (Thyagarajan *et al.*, 2014).

Yu *et al.* 2010 dan Liu *et al.* 2011 mengemukakan bahwa mineral Zn merupakan mineral esensial yang berperan penting dan dibutuhkan pada aktivitas lebih dari 300 enzim dalam tubuh dan beberapa aktivitas biologis serta fungsi fisiologis pada ternak unggas, terutama pada masa pertumbuhan. Hal ini dibuktikan

dengan beberapa hasil percobaan imbuhan Zn inorganik dan organik pada ransum yang mampu meningkatkan produktivitas ayam broiler. Defisiensi Zn terjadi ketika dalam ransum unggas terkandung asam fitat tinggi (dalam hidayat, 2015). Yu *et al.* 2010 melaporkan bahwa asam fitat dengan Zn membentuk ikatan kuat yang tidak dapat dicerna dalam saluran pencernaan unggas. Dalam mengatasi hal tersebut, dapat dilakukan pemberian suplementasi enzim fitase sebagai bahan pakan aditif mampu melepaskan ikatan fitat dengan Ca, Zn, Cu, dan Mn, serta meningkatkan relaksasi usus, dan absorpsi nutrisi (Liu, *et al.* , 2014).

Enzim fitase atau *mio inositol heksakisfosfat fosfohidrolase* adalah enzim yang dapat menghidrolisis ikatan fosfoester pada asam fitat, menghasilkan inositol, fosfat anorganik, protein dan mineral, sehingga fosfat, protein dan mineral mudah diserap oleh usus, dapat meningkatkan kualitas nutrisi dan mengurangi polusi fosfat (Sari, 2012).

Guna mengatasi permasalahan tentang asam fitat, maka berbagai penelitian telah menunjukkan potensi mikroorganisme yang menghasilkan enzim fitase antara lain Cho, *et al.*,(2003) telah mengarakterisasi enzim fitase dari *Pseudomonas syringae* MOK1. Gulati, *et al.*, (2007) berhasil mengisolasi *Bacillus laevolacticus* yang memiliki aktivitas alkaline fitase termotabil. Ramesh *et al.*, (2011) mengisolasi bakteri *Bacillus* sp dari rhizosfer yang memiliki aktivitas fitase (dalam Andriyani 2014).

Pada penelitian terpisah, telah diisolasi dan diseleksi bakteri endofit penghasil fitase asal tanaman jagung (*Zea mays*) dan mendapatkan 4 isolat yang masing-masing

mewakili isolat dengan indeks fitatik tertinggi dari setiap organ tanaman jagung (*Zea mays* L). Kemudian isolat bakteri yang memiliki indeks fitatik tertinggi tersebut, diidentifikasi berdasarkan karakter morfologi, biokimia dan diidentifikasi secara molekuler. Hasil analisis BLAST menunjukkan bahwa spesies dari koloni bakteri akar 10^{-7} KL 7 merupakan bakteri *Burkholderia lata* strain 383 (Nurhikmah dan Harvianti, 2017). Bakteri yang diisolasi tersebut, berpotensi untuk diaplikasikan pada pakan ternak monogastrik khususnya unggas dalam bidang industri pellet dalam bentuk suplementasi enzim fitase, dengan demikian, asam fitat yang terdapat pada pakan ternak komersial yang berasal dari biji-bijian, sereal, dan legum dapat dihidrolisis dengan adanya enzim fitase, sehingga dapat meningkatkan ketersediaan protein dan energi, serta kalsium (Ca) dan fosfor (P) untuk ternak unggas.

Enzim dapat diperoleh dengan cara mengisolasi dari sumbernya. Mengeluarkan enzim dari sumbernya perlu dilakukan isolasi yang dapat dikerjakan dengan cara ekstraksi dan sentrifugasi. Enzim yang telah diisolasi tersebut, kemudian dapat dimanfaatkan lebih lanjut dalam berbagai bidang ilmu pengetahuan misalnya dalam bidang industri salah satunya industri pakan ternak (Mashuri, 2014).

Pemurnian merupakan tahap yang penting setelah enzim diisolasi. Berdasarkan informasi dari metode pemurnian yang berbeda, maka dalam penelitian ini dipilih metode yang lebih sederhana yaitu tahap pertama pemurnian dengan melakukan sentrifugasi untuk menghasilkan *crude enzym*, selanjutnya pengendapan amonium sulfat, dialisis, kemudian dilanjutkan dengan kromatografi filtrasi gel matriks sephadex G-100.

Peningkatan aktivitas suatu enzim dapat dilakukan dengan pemurnian melalui kromatografi. Salah satu teknik pemurnian yang dikenal dilakukan dengan filtrasi gel menggunakan sephadexs. Pemurnian dengan menggunakan kromatografil filtrasi gel menguntungkan karena dalam prosesnya struktur enzim relatif tidak berubah, hal ini disebabkan karena dalam proses tersebut tidak terjadi ikatan antara enzim dengan matriksnya (Sahar, 2015).

Berdasarkan latar belakang tersebut maka dilakukan suatu penelitian dengan judul “Isolasi dan Purifikasi Fitase dari isolat bakteri endofit penghasil fitase asal tanaman jagung (*Zea mays*)”.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian pada latar belakang, maka dirumuskan permasalahan sebagai berikut :

1. Bagaimana tingkat kemurnian enzim fitase dari bakteri endofit asal tanaman jagung (*Zea mays*)?

C. Ruang Lingkup Penelitian

Ruang lingkup dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Isolat bakteri endofit penghasil fitase diperoleh dari hasil isolasi tanaman jagung. Tanaman jagung yang digunakan merupakan koleksi Balit Sereal, Maros. Isolat bakteri dipilih berdasarkan indeks fitatik (IF) tertinggi, dimana masing-masing isolat mewakili setiap organ tanaman jagung (*Zea mays*) yaitu akar, batang, daun dan biji. Yang kemudian diidentifikasi secara molekuler

yang menunjukkan bahwa isolat dari akar memiliki kesamaan 99% dengan *Burkholderia lata* Strain 383.

2. Mengisolasi fitase dari bakteri endofit penghasil fitase asal tanaman jagung (*Zea mays*) untuk dimurnikan lebih lanjut dengan menggunakan kromatografi filtrasi gel sephadex G-100.
3. Penelitian ini dibatasi hanya untuk memurnikan fitase dari bakteri endofit asal tanaman jagung.

D. Kajian Pustaka/ Penelitian Terdahulu

Dalam kajian pustaka dibahas beberapa temuan hasil penelitian sebelumnya untuk melihat kejelasan arah, originalitas, kemanfaatan, dan posisi dari penelitian ini, dibandingkan dengan beberapa temuan penelitian yang dilakukan sebelumnya. Adapun penelitian yang telah memurnikan fitase dari berbagai mikroorganisme yaitu sebagai berikut:

1. Penelitian tentang pemurnian partial fitase dari *Hypocrea lixii* SURT01 yang dilakukan oleh R. Thyagarajan *et al* (2014) memperoleh hasil yaitu aktivitas spesifik ekstrak kasar enzim sebesar $91 \text{ Uml}^{-1}/\text{mg}^{-1}$ dan meningkat menjadi $160,8 \text{ Uml}^{-1}/\text{mg}^{-1}$ setelah dipresipitasi menggunakan amonium sulfat. Kemudian aktifitas spesifik lebih meningkat setelah dilakukan pemurnian menggunakan kromatografi filtrasi gel Sephadex G-150 yaitu sebesar $377,5 \text{ Uml}^{-1}/\text{mg}^{-1}$. Berat molekul fitase murni sekitar 56 kDa yang dianalisis menggunakan SDS-PAGE.

2. Penelitian yang dilakukan oleh El-Toukhy *et al* (2013) dengan judul isolasi, purifikasi, dan karakterisasi fitase dari *Bacillus subtilis* MJA, yaitu tiga strain bakteri

diisolasi dari tanah. Diantara ketiga strain bakteri tersebut, salah satunya diidentifikasi secara morfologi kemudian dilanjutkan teknik identifikasi molekuler sebagai *Bacillus subtilis* MJA dengan aktivitas fitase yang tinggi. Kemudian dilakukan optimalisasi produksi fitase dari *Bacillus subtilis* MJA. Produksi fitase kemudian dimurnikan dengan menggunakan kromatografi penukar ion DEAE-Sepharose, adapun hasilnya yaitu aktivitas spesifik enzim fitase meningkat sebesar 2,008 (U/mg) dari ekstrak kasar enzim yaitu 1,075 (U/mg) kemudian setelah dimurnikan lagi dengan menggunakan Sephacryl S-100 HR aktivitas spesifik enzim meningkat menjadi 4,244 (U/mg).

3. Penelitian yang dilakukan oleh Shimizu (1992) dengan judul purifikasi dan karakterisasi fitase dari *Bacillus subtilis (natto)* N-77 memperoleh hasil yaitu isolat yang mampu memproduksi fitase diisolasi dari *natto* yang merupakan makanan komersial fermentasi dari kedelai asal Jepang. Isolat dikultivasi dalam medium produksi selanjutnya dimurnikan. Hasil pemurnian yaitu aktivitas spesifik enzim fitase meningkat menjadi 8,7 (U/mg) menggunakan ultrafiltrasi, dan penggabungan kromatografi filtrasi gel Sephadex G-100 dan DEAE-Sepharose CL-6B. Berat molekul enzim murni sekitar 38 kDa yang dianalisis menggunakan SDS-PAGE.

4. Penelitian yang dilakukan oleh Sri Widowati di balai penelitian bioteknologi tanaman pangan, Bogor pada tahun 2001 dengan judul Karakterisasi fitase dari *Bacillus coagulans* memperoleh hasil pemurnian fitase 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. Enzim

kasar kemudian dilakukan *salting out* dengan menggunakan amonium sulfat 70%. 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. Enzim 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.

5. Penelitian oleh Miswar yang dilakukan di Pusat Penelitian Biologi Molekul dan Fakultas Pertanian Universitas Jember, Jember dengan judul isolasi dan purifikasi fitase dari kotiledon kedelai [*glycine max* (L.) merr.] hasil perkecambahan memperoleh hasil penelitian yang menunjukkan bahwa biji kedelai var. Bromo yang dikecambahkan selama 10 hari menghasilkan aktivitas *fitase* kotiledon tertinggi. Purifikasi fitase kotiledon kedelai dengan amonium sulfat dan fraksinasi dengan DEAE-celulose menghasilkan tiga bentuk fitase. Fitase 2 mempunyai aktivitas spesifik tertinggi jika dibandingkan dengan fitase yang lain (fitase 1 dan 3).

E. Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan dan identifikasi masalah, maka tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini yaitu untuk:

1. Mengetahui tingkat kemurnian fitase dari bakteri endofit penghasil fitase asal tanaman jagung (*Zea mays*).

F. Kegunaan penelitian

Adapun manfaat dan kegunaan yang diharapkan dari penelitian ini adalah :

1. Memperoleh enzim fitase murni dari bakteri endofit penghasil fitase asal tanaman jagung (*Zea mays*) terpilih.
2. Enzim Fitase yang telah dimurnikan dapat dijadikan sebagai bahan untuk penelitian selanjutnya dengan mengaplikasikan fitase murni dalam pembuatan pakan ternak komersial sehingga masalah kurangnya penyerapan nutrisi terutama untuk ternak monogastrik dapat teratasi.
3. Dapat bermanfaat bagi ilmuwan dan peneliti sebagai referensi tambahan yang relevan untuk memurnikan enzim fitase dari bakteri endofit penghasil fitase asal tanaman jagung (*Zea mays*).



BAB II

TINJAUAN TEORITIS

A. Ayat yang Relevan

Secara tersirat, mengenai penciptaan bakteri dijelaskan melalui firman Allah swt. dalam QS. Al-Nur/24:45

وَاللَّهُ خَلَقَ كُلَّ دَابَّةٍ مِّن مَّاءٍ ۖ فَمِنْهُمْ مَّن يَمْشِي عَلَىٰ بَطْنِهِ ۚ وَمِنْهُمْ مَّن يَمْشِي
عَلَىٰ رِجْلَيْنِ وَمِنْهُمْ مَّن يَمْشِي عَلَىٰ أَرْبَعٍ ۗ تَخْلُقُ اللَّهُ مَا يَشَاءُ ۗ إِنَّ اللَّهَ عَلَىٰ
كُلِّ شَيْءٍ قَدِيرٌ ﴿٤٥﴾

Terjemahnya:

dan Allah telah menciptakan semua jenis hewan dari air, maka sebagian dari hewan itu ada yang berjalan di atas perutnya dan sebagian berjalan dengan dua kaki sedang sebagian (yang lain) berjalan dengan empat kaki. Allah menciptakan apa yang dikehendaki-Nya, sesungguhnya Allah Maha Kuasa atas segala sesuatu (Kementerian Agama RI, 2009).

M.Quraish Shihab (2002) menjelaskan bahwa: dan, disamping bukti-bukti kekuasaan dan limpahan anugerah-Nya, *Allah juga telah menciptakan semua jenis hewan dari air yang memancar sebagaimana Dia menciptakan tumbuhan dari air tercurah. Lalu Allah menjadikan hewan-hewan itu beraneka ragam jenis, potensi dan fungsi, maka sebagian dari mereka, yakni hewan itu, ada yang berjalan diatas perutnya seperti buaya, ular dan hewan yang melata lainnya, dan sebagian berjalan*

dengan dua kaki seperti manusia, burung, *sedang sebagian lain berjalan dengan empat kaki* seperti sapi, kambing dan lainnya. Ada juga yang berjalan lebih dari empat kaki yaitu kalajengking, laba-laba dan lain-lain. Memang, Allah Mahakuasa lagi Mahabijaksana karena itu Allah secara terus-menerus *menciptakan apa* dan dengan cara serta bahan *yang dikehendaki-Nya*, sebagai bukti kekuasaan-Nya *sesungguhnya Allah mahakuasa atas segala sesuatu* (Shihab, 2002).

Ayat tersebut memberi pengilhaman kepada manusia, bahwa penciptaan hewan menunjukkan kekuasaan Allah sekaligus kehendak-Nya yang mutlak. Dari satu sisi, bahan penciptaannya sama yaitu air, tetapi air dijadikannya berbeda-beda, lalu dengan perbedaan itu Dia menciptakan makhluk yang memiliki potensi dan fungsi berbeda-beda pula termasuk diciptakannya bakteri. Pada ayat tersebut terdapat penyebutan *“dan Allah telah menciptakan semua jenis hewan dari air”* apabila kita mengkaji lebih dalam mengenai maknanya, jelas bahwa air merupakan komponen utama dan terbesar penyusun tubuh dari semua makhluk hidup tak terkecuali bakteri. Dengan demikian, dapat dimaknai bahwa ayat tersebut menginformasikan kepada kita manusia, bahwa Allah swt. telah menciptakan segala sesuatu yang dikehendaki-Nya, termasuk bakteri penghasil enzim fitase, meskipun berukuran sangat kecil tetapi dapat bermanfaat bagi kehidupan manusia karena dengan bakteri yang dapat menghasilkan enzim fitase ini, maka dapat dijadikan sumber informasi kepada masyarakat dan diaplikasikan dalam industri peternakan agar dapat meningkatkan kualitas pakan ternak dan produktifitas hewan ternak.

Pentingnya enzim yang merupakan suatu protein sejalan dengan hikmah penyebutan kata hewan dalam ayat al-Qur'an tersebut. Kemudian, dalam QS. Yaasin/36:33 Allah SWT berfirman:

وَأَيُّهُمْ أَهْمُ الْأَرْضِ الْمَيِّتَةِ أَحْيَيْنَاهَا وَأَخْرَجْنَا مِنْهَا حَبًّا فَمِنْهُ يَأْكُلُونَ



Terjemahnya:

Dan suatu tanda (kekuasaan Allah yang besar) bagi mereka adalah bumi yang mati. Kami hidupan bumi itu dan Kami keluarkan dari padanya biji-bijian, maka daripadanya mereka makan (Kementerian Agama RI, 2009).

Menurut Shihab (2002) penggunaan bentuk jamak pada kata *ahyaina* dan *akhrajna* mengisyaratkan adanya keterlibatan selain Allah dalam hal menghidupkan bumi dan menumbuhkan tumbuh-tumbuhan. Keterlibatan tangan manusia adalah salah satunya, manusialah yang menanam biji kemudian Allah menumbuhkan. Maka dari itu keluarlah buah dan biji yang bermanfaat dan berguna untuk kebutuhan hidup makhluk.

Berdasarkan penafsiran ayat ini, salah satu bentuk kuasa Allah yaitu ditumbuhkannya berbagai macam tanaman yang dapat bermanfaat bagi kehidupan manusia. Kata “*biji-bijian*” dalam QS.Yaasin ayat 33 ini dapat dimaknai agar kita mengetahui berbagai jenis tanaman biji-bijian. Salah satu tanaman biji-bijian adalah Jagung. Jagung (*Zea mays* L.) dapat dijadikan sebagai alternatif pangan karena mengandung karbohidrat. Jagung mengandung pati, protein, asam lemak, dan mineral

esensial seperti K, Na, P, Ca, Fe, dan Zn (Nisa dan Yuanita, 2014). Komposisi tersebut menunjukkan bahwa jagung merupakan sumber karbohidrat yang sangat potensial untuk dikembangkan dalam rangka diversifikasi konsumsi pangan. Selain itu, karena pesatnya perkembangan industri pakan ternak pada era modern sekarang ini, maka semakin tinggi pula permintaan jagung yang merupakan bahan bakunya. Jagung juga mengandung senyawa antinutrisi berupa asam fitat sebesar 0,29 % (Sari, 2012) yang dapat mengikat protein dan ion logam seperti Zn membentuk kompleks fitat-protein dan fitat-Zn yang sukar larut (Irianingrum, 2009) sehingga memberikan efek yang kurang baik pada tubuh. Untuk mengatasi masalah tersebut, digunakan enzim fitase untuk menghidrolisis asam fitat yang merupakan zat antinutrisi.

B. Tinjauan Umum Enzim

Tanpa adanya bantuan enzim, reaksi kimia akan berlangsung sangat lambat dan proses metabolisme di dalam tubuh makhluk hidup tidak akan terjadi. Sebagai biokatalisator yang mengatur semua kecepatan proses fisiologis, enzim memegang peranan utama dalam kesehatan dan penyakit (Nurjannah, 2013). Organisme hidup mampu mendapatkan dan menggunakan energi dengan cepat karena adanya katalis biologis yang disebut enzim. Enzim adalah golongan protein, paling banyak terdapat dalam sel hidup yang mengkatalisis reaksi-reaksi biokimia. Pada zaman sekarang ini, ribuan enzim telah diidentifikasi yang masing-masing berfungsi sebagai biokatalisator reaksi kimia dalam sistem hidup. Sintesis enzim terjadi di dalam sel dan sebagian besar enzim dapat diperoleh dengan ekstraksi dari jaringan tanpa merusak fungsinya (Yazid dan Nursanti, 2006).

Enzim biasanya terdapat dalam sel dengan konsentrasi yang sangat rendah, selain itu juga enzim mempunyai kemampuan untuk meningkatkan laju reaksi tanpa mengubah posisi kesetimbangan (Kuchel dan Gregory 2006). Enzim ikut ambil bagian dalam seluruh aktivitas yang diperlukan untuk mempertahankan kehidupan, seperti sintesis dan penguraian, ekskresi, detoksifikasi, dan penyediaan energi (Shinya, 2008).

Enzim merupakan kelompok protein yang berperan sebagai katalisator untuk proses biokimia yang terjadi di dalam maupun diluar sel. Enzim disintesis oleh sel biologi seluruh organisme hidup dan terlibat dengan reaksi kimiawi metabolisme (Indah, 2004 dalam Nurjannah, 2013). Enzim merupakan reaksi atau proses kimia yang berlangsung dengan baik dalam tubuh kita ini dimungkinkan karena adanya katalis. Pengetahuan tentang katalis telah dirintis oleh Berzelius pada tahun 1837. Ia mengusulkan nama katalis untuk zat-zat yang dapat mempercepat reaksi kimia tetapi zat itu sendiri tidak ikut bereaksi (Poedjiadi, 2006).

Sebagai katalisator, enzim berbeda dengan katalisator anorganik dan organik sederhana yang umumnya dapat mengatalisis berbagai reaksi kimia. Enzim mempunyai spesifitas yang sangat tinggi, baik terhadap reaktan (substrat) maupun jenis reaksi yang dikatalisiskan, pada umumnya, suatu enzim hanya mengatalisis satu jenis reaksi dan bekerja pada suatu substrat tertentu. Kemudian enzim dapat meningkatkan laju reaksi yang luar biasa tanpa pembentukan produk samping dan molekul berfungsi dalam larutan encer pada keadaan biasa (fisiologis) tekanan, suhu,

dan pH normal. Hanya sedikit katalisator nonbiologi yang dilengkapi sifat-sifat demikian (Yazid dan Nursanti, 2006).

Oleh adanya enzim sebagai katalisator, reaksi-reaksi dapat dipercepat kira-kira 10^{12} sampai 10^{20} kali jika dibandingkan dengan reaksi tanpa katalisator (Ristiati, 2000). Enzim mempercepat laju reaksi tanpa ikut bereaksi, mempercepat laju reaksi hingga berjuta-juta kali. Sifatnya sangat spesifik; hanya bekerja pada reaksi yang spesifik, misalnya amylase hanya mengatalis reaksi pemecahan amilum menjadi subunit glukosa. Enzim memegang peranan penting dalam kehidupan sehingga sangat perlu untuk mengetahui cara kerja enzim agar dapat digunakan dalam industri obat-obatan, biokimia dan industri lainnya (Sukmawaty, 2015).

Di dalam tubuh terdapat lebih dari 2500 reaksi biokimia yang berbeda dengan bantuan enzim spesifik yang sesuai untuk meningkatkan laju reaksinya. Masing-masing enzim dicirikan oleh spesifitasnya untuk substrat (reaktan) yang mirip secara biologis. Molekul-molekul lain juga dapat mengatur aktivitas enzim, molekul-molekul ini disebut efektor dan dapat bersifat sebagai aktivator, inhibitor atau keduanya (Kuchel dan Gregory 2006).

Enzim mengikat kompleks molekul substrat membentuk kompleks enzim-substrat (E-S) yang bersifat sementara yang terurai membentuk enzim bebas dari produknya (Lehninger, 1990). Bila konsentrasi substrat (S) meningkat aktivitas katalitik konsentrasi enzim (E) akan meningkat mengikuti pola hiperbolik mendekati kecepatan maksimalnya yang khas. Pada saat ini praktis semua enzim berada dalam bentuk kompleks (ES) dan karenanya jenuh oleh substrat (Lehninger, 1990).

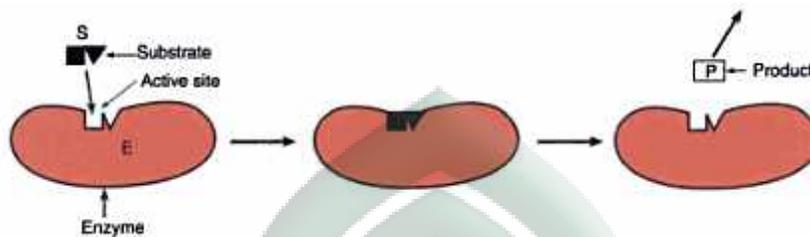
Semua enzim pada hakikatnya adalah protein. Beberapa diantaranya mempunyai struktur agak sederhana, sedangkan sebagian besar lainnya memiliki struktur unit. Namun, kebanyakan enzim baru berfungsi sebagai katalis apabila disertai zat lain yang bukan protein, yang disebut kofaktor. Suatu kofaktor dapat berupa ion sederhana seperti Fe^{2+} atau Cu^{2+} , tetapi dapat pula berupa molekul organik kompleks yang disebut koenzim. Bagian protein dari enzim yang disebut apoenzim. Kemudian, gabungan apoenzim dan kofaktornya sehingga disebut enzim menjadi aktif disebut holoenzim (Yazid dan Nursanti, 2006).

Enzim merupakan unit fungsional dari metabolisme sel. Enzim bekerja dengan urutan-urutan yang teratur dan mengatalisis ratusan reaksi dari reaksi yang sangat sederhana seperti replikasi kromosom sampai ke reaksi yang sangat rumit, misalnya reaksi yang menguraikan molekul nutrien; menyimpan; dan mengubah energi kimiawi. Masing-masing reaksi dikatalisis oleh sejenis enzim tertentu. Diantara sejumlah enzim tersebut, ada sekelompok enzim yang disebut enzim pengatur (Yazid dan Nursanti, 2006).

C. Cara kerja enzim dan Faktor-faktor yang mempengaruhinya

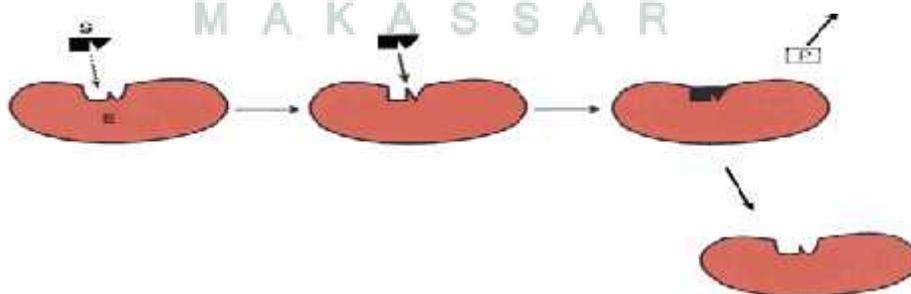
Enzim bekerja dengan dua cara, yaitu menurut teori kunci-gembok (*Lock and Key Theory*) dan teori kecocokan induksi (*Induced Fit Theory*). Menurut teori kunci-gembok, terjadinya reaksi antara substrat dengan enzim karena adanya kesesuaian bentuk ruang antara substrat dengan sisi aktif (*active site*) dari enzim, sehingga sisi aktif enzim cenderung kaku. Substrat berperan sebagai kunci masuk ke dalam situs aktif, yang berperan sebagai gembok, sehingga terjadi kompleks enzim-substrat.

Ikatan kompleks enzim-substrat terputus, produk hasil reaksi akan dilepas dan enzim akan kembali pada konfigurasi semula. Mekanisme teori kunci gembok disajikan pada Gambar dibawah ini:



Gambar 2.1 teori kunci-gembok (Stenes, 1998).

Berbeda dengan teori kunci-gembok, teori induksi enzim menekankan pada enzim melakukan penyesuaian bentuk untuk berikatan dengan substrat. Hal ini bertujuan untuk meningkatkan kecocokan dengan substrat dan membuat ikatan enzim substrat lebih reaktif. Molekul enzim memiliki sisi aktif tempat melekatnya substrat dan terbentuk molekul kompleks enzim-substrat. Pengikatan substrat menginduksi penyesuaian pada enzim yang meningkatkan kecocokan dan mendorong molekul kompleks enzim-substrat (Chang 2003). Mekanisme teori kecocokan induksi disajikan pada Gambar di bawah ini :



Gambar 2.2 Teori kecocokan induksi (Stenes 1998).

D. Klasifikasi enzim

Sistem penamaan dan klasifikasi enzim telah diambil dari hasil persetujuan internasional dan diberi nomor kode/sandi. Pembagian didasarkan pada reaksi yang dikatalisisnya. Sistem membaginya menjadi 6 kelas utama. Klasifikasi enzim berdasarkan atas reaksi katalisisnya (Buxbaum 2007 dalam Dynnar, 2014) :

1. Oksidoreduktase : Enzim yang mengkatalisis reaksi oksidasi atau reduksi suatu substrat. Dua macam enzim yang paling utama, yakni oksidase dan dehidrogenase. Oksidase ialah enzim yang mengkatalisis reaksi antara substrat dengan molekul oksigen. Contoh: katalase, peroksidase, tirosinase, dan asam askorbat oksidase. Dehidrogenase ialah enzim yang aktif dalam pengambilan atom hidrogen dari substrat. Contoh: Enzim suksinat dehidrogenase yang memecah asam suksinat menjadi asam fumarat
2. Tranferase : Reaksi yang dikatalisisnya merupakan reaksi pemindahan gugus fungsional. Contoh: transglikosidase, transfosforilase, transaminase, dan tranasetilase.
3. Hidrolase : Enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis suatu substrat atau memecah substrat dengan pertolongan molekul air. Contoh: lipase dan amilase.
4. Liase : Enzim yang aktif dalam pemecahan C-C dan C-O dengan tidak menggunakan molekul air. Contoh: enzim dekarboksilase yang memecah ikatan C-C
5. Isomerase : Jenis reaksi yang dikatalisisnya adalah pemindahan gugus di dalam molekul, menghasilkan bentuk isomer.

6. Ligase : Reaksi yang dikatalisisnya merupakan reaksi pembentukan ikatan C-C, C-S, C-O, dan C-N oleh reaksi kondensasi yang berkaitan dengan penguraian ATP.

Enzim yang menghidrolisis pemutusan ikatan peptida pada protein diklasifikasikan menjadi dua kelompok besar, yaitu golongan eksopeptidase dan golongan endopeptidase. Golongan eksopeptidase mengkatalisis hidrolisis pemutusan ikatan peptida dari rantai peptida suatu protein, tempat pemutusannya dari tepi atau dari ujung, baik di ujung yang mengandung gugus karboksil maupun yang mengandung gugus amino. Golongan ini dibedakan atas karboksiptidase dan aminopeptidase. Karboksiptidase mengkatalisis hidrolisis pemutusan ikatan peptida pada rantai peptida molekul protein, dimulai dari ujung tempat gugus karboksil bebas. Tiap penyerangan atau pemutusan ikatan peptida dilepaskan sebuah asam amino (Bregman, 1996 dalam Dynnar, 2011).

Semua enzim diberi nama menurut sistem yang dirancang oleh komisi enzim (Enzyme Commission, EC) dari *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), dan berdasarkan tipe reaksi yang dikatalisis enzim tersebut. Setiap tipe enzim mempunyai empat digit nomor EC yang spesifik, serta nama yang kompleks namun jelas dan bisa menepis kebingungan tentang enzim-enzim yang mengkatalisis reaksi yang serupa tetapi tidak identik (Ngili, 2013).

E. Asam Fitat

Jagung merupakan sumber karbohidrat, dan kandungan gizi utama jagung adalah pati (72-73%), kadar gula sederhana jagung (glukosa, fruktosa, dan sukrosa)

berkisar antara 1-3%, protein jagung (8-11%), jagung juga mengandung asam lemak, vitamin, dan mineral esensial seperti K, Na, P, Ca, Zn, dan Fe. Kandungan mineral Ca biji jagung berkisar antara 20,1-28,7 mg/100 g (Suarni, 2001). Jagung juga mengandung sekitar 90% asam fitat dan fitin (asam fitat dalam bentuk garam) yang merupakan bentuk penyimpanan fosfor (Insun, 2004). Asam fitat merupakan bentuk penyimpanan fosfor yang terbesar pada tanaman biji-bijian sereal dan leguminosa yang tidak dapat dihidrolisis dalam saluran pencernaan hewan monogastrik (Thyagarajan *et al.*, 2014; Tungala *et al.*, 2013., Panday *et al.*, 2001).

Kandungan asam fitat sangat banyak terdapat dalam tumbuhan, sel mikroorganisme dan ternak. Biji-bijian tumbuhan mengandung 60-90% fosfor terikat fitat dalam bentuk garam asam fitat. Asam fitat terdapat pada tanaman pangan seperti jagung, gandum, kedelai, kacang tanah, padi dan juga terkandung dalam bunga matahari (Wulandari, 2011).

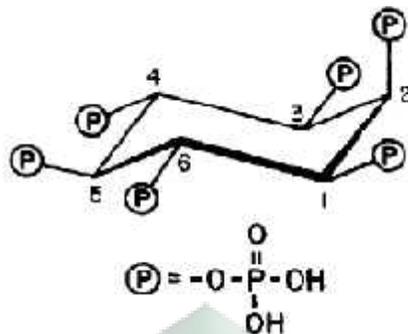
Kandungan fitat pada bahan makanan sangat beragam. Lokasi penyimpanan fitat pada biji juga bervariasi, contohnya pada biji yang berukuran kecil fitat terutama terletak pada kulit ari (lapisan *aleurone*, *prikarp*), pada jagung ditemukan pada embrio, sedangkan pada kedelai didistribusikan ke seluruh bagian biji (Kornegay 1996 dalam Amelia, 2010).

Tabel 2.1 Kandungan fitat pada beberapa jenis biji (Kornegay, 2010)

Jenis Fitat	P Fitat (g/kg)	% fitat P terhadap P total
Gandum	1,9-2,9	61-78

Jagung	1,6-2,6	61-85
Shorgum	1,9-2,9	61-76
<i>Barley</i>	1,9-2,4	55-62
<i>Oats</i>	1,6-3,5	48-78
<i>Lupins</i>	2,9-3,0	54-55
<i>Peas</i>	1,3-2,1	36-53
<i>Chick Peas</i>	2,0-2,3	49-53
Kedelai	2,8-4,0	46-61
Kanola	4,6-7,8	36-70
Bunga Matahari	3,2-5,1	35-47

Asam fitat ($C_6H_{18}O_{24}P_6$) merupakan senyawa kimia yang terdiri atas inositol dan asam fosfat. Terdapat enam gugus asam fosfat yang terikat pada cincin inositol. Secara kimiawi, asam fitat disebut *myo*-inositol 1,2,3,4,5,6-heksakis (dihidrogen fosfat) (Reddy *et al.*, 1982 dalam Irianingrum, 2009). Secara struktural asam fitat dipaparkan sebagai suatu cincin *myo*-inositol yang mengikat penuh 6 fosfat disekeliling cincin Rantai C dikelilingi oleh 6 atom fosfat yang berikatan dengan oksigen dan hidrogen (Cosgrove, 1980 dalam Sari, 2012) yang diilustrasikan pada gambar dibawah ini:



Gambar 2.3 Struktur molekuler asam fitat (Sumber: B.-L. Liu *et al.*, 1998).

Asam fitat mengandung enam gugus fosfat yang bermuatan negatif pada berbagai variasi harga pH. Oleh karena itu, asam fitat pada pH netral membentuk senyawa kompleks dengan berikatan pada ion-ion logam seperti Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , dan Ca^{2+} . Ikatan fitat-Zn dan fitat-Cu merupakan ikatan yang stabil dan tidak larut sehingga absorpsinya di dalam saluran pencernaan menurun (Piliang, 2000). Hal ini menyebabkan mineral dan protein tidak dapat diserap tubuh, atau nilai cernanya rendah. Oleh karena itu, asam fitat dianggap sebagai faktor anti nutrisi yang menurunkan kualitas pakan (Thyagarajan *et al.*, 2014). Adanya asam fitat menyebabkan beberapa mineral dan protein menjadi tidak terlarut sehingga tidak dapat diserap oleh usus manusia dan hewan monogastrik (Liu *et al.*, 2005). Sehingga ternak mengalami defisiensi mineral dan nutrisi (Pangastuti dan Triwibowo, 1996; Susana, *et al.*, 2000 dalam Andriyani 2014).

Ditinjau dari sisi manfaatnya terhadap tanaman, fitat penting untuk pertumbuhan biji ketika metabolisme biji terhambat dan terjadi dormansi dan turut berperan dalam meningkatkan hasil panen, tanaman dan perkecambahan biji sebagai sumber ATP, berperan pada fungsi biologis penyimpanan fosfor dan kation yang

dibutuhkan untuk pertumbuhan bibit tanaman. Kebanyakan tanaman yang mengandung asam fitat tersebut merupakan sumber pangan pada ternak maupun manusia (Wulandari, 2011). Namun jika dilihat dari sudut pandang hewan, fitat merupakan komponen anti nutrisi (Thompson, 1993 dalam Nuhriawangsa, 2012).

Asam fitat juga memiliki banyak manfaat bagi kesehatan. Asam fitat memiliki fungsi penting sebagai antioksidan, sehingga dapat menghambat terjadinya radikal bebas dan kanker (Tran, 2010 dalam Sari, 2012). Namun, interaksi fitat-protein menyebabkan penurunan aktivitas enzim-enzim pencernaan seperti α -amilase, lipase, pepsin, tripsin, maupun kimotripsin serta menurunkan kelarutan dan daya cerna protein. Pengaruh inhibisi asam fitat atau garam fitat semakin kuat, seiring dengan meningkatnya konsentrasi fitat maupun bertambahnya gugus fosfat yang terikat pada mio-inositol (Kusumadjaja, 2009).

Kondisi fitat yang tidak tercerna oleh tubuh, menyebabkan sebagian besar fosfor dan mineral lain akan diekskresikan melalui feses, yang akan terdegradasi oleh bakteri penghasil fitase. Selain itu, untuk memenuhi kekurangan fosfor pada bahan pangan maka digunakan fosfor anorganik yang tak terurai sebagai suplemen pakan ternak. Hal ini mengakibatkan terlepasnya fosfor ke lingkungan yang akan memicu eutrofikasi (Amin, *et al.*, 2010 dalam Andriyani 2014).

F. Fitase

Pemanfaatan enzim dari berbagai bidang industri disebabkan karena enzim merupakan bahan alami yang tidak beracun, dapat mempercepat reaksi tanpa menyebabkan terbentuknya hasil reaksi yang tidak diinginkan. Kecepatan reaksi

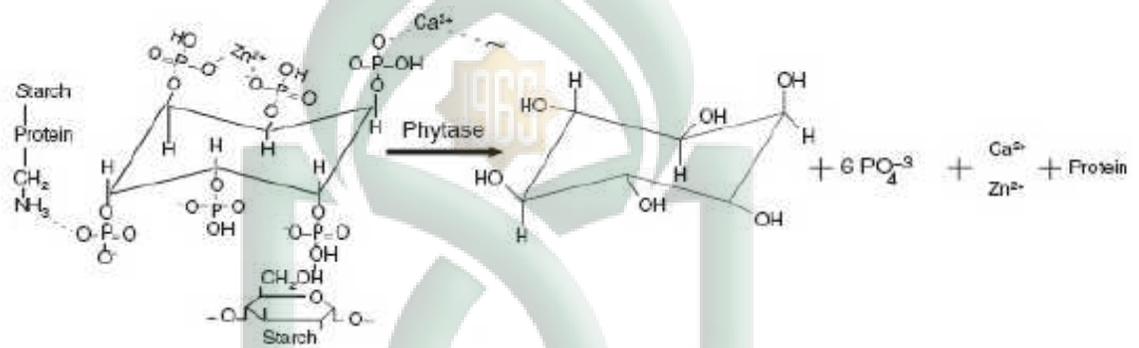
dapat diatur dengan mengatur pH, suhu dan jumlah enzim yang digunakan. Enzim aktif pada konsentrasi rendah dan dapat dinaktifkan jika reaksi yang dimaksud sudah tercapai. Selain itu, enzim juga merupakan senyawa alamiah yang bersifat *biodegradable* dan ramah lingkungan (Indarwati, 2000).

Fitase atau *myo-inositol-hexakisphosphate phosphohydrolase*(EC3.1.3.8.) pertama kali ditemukan oleh Suzuki *et al* pada penelitiannya yang berjudul *the course of rice bran hydrolyzing studies*. Mereka menemukan enzim tersebut berada pada bekatul yang dapat menghidrolisis asam fitat menjadi inositol dan orthophosphorik (B-L. Liu *et al*, 1998). *The Enzym Nomenclature Committe Of The International Union Of Biochemistry* mengklasifikasikan tiga tipe fitase, yaitu 3-fitase (EC. 3.1.3.8), 4-fitase (EC. 3.1.3.26) dan 5-fitase (EC. 3.1.3.72). klasifikasi ini didasarkan pada posisi gugus fosfat pertama yang dihidrolisis enzim. Enzim 3-fitase, umumnya terdapat pada mikroorganisme. Enzim ini memulai reaksi hidrolisis asam fitat pada gugus fosfat posisi D-3, menghasilkan produk awal D-inositol (1,2,3,4,5,6)P₅ (Kusumadaja, 2009 ., Susana dkk., 2010).

Fitase (*Myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase*) merupakan enzim yang berfungsi menghidrolisis asam fitat (*myo-inositol hexakisphosphate*) menghasilkan ortofosfat dan *myo-inositol pentakisphosphate*, bahkan pada kondisi-kondisi tertentu menjadi fosfat dan *myo-inositol* bebas dan dapat menghilangkan sifat pengkhelet dari asam fitat (Konietzny dan Greiner 2002 dalam Susiyanti, 2007).

Fitase pada umumnya digunakan sebagai bahan tambahan pada makanan ternak untuk meningkatkan kualitas nutrisi bahan pangan dan produk pakan yang

mengandung fosfat, dengan cara mereduksi asam fitat. Menurut Yao *et al.*, (2011) asam fitat memiliki ikatan yang kompleks dengan pati, protein, dan mineral lain yang tidak mudah larut sehingga tidak dapat diserap oleh usus. Adanya penambahan fitase akan menghidrolisis asam fitat menjadi 1 molekul inositol, 6 molekul fosfat anorganik, ion Ca^{2+} , Zn^{2+} dan protein (Gambar 2.5), sehingga fosfat dan mineral yang terikat dapat dilepaskan dan dimanfaatkan oleh tubuh.



Gambar 2.4 Hidrolisis asam fitat oleh fitase sumber (Yao *et al.*,2011)

Melalui teknik enzimatik sangat mungkin terjadi degradasi sempurna terhadap fitat sereal maupun kacang-kacangan (Yuanita,2010). Berbagai mineral yang berikatan dalam kompleks fitat hanya dapat digunakan apabila grup fosfatnya terdegradasi oleh enzim fitase. Menurut Lei and Stahl (2001) terjadi penurunan fosfor yang dilepas ke lingkungan sebanyak 50%, pada hewan yang pakannya diberi enzim fitase. Enzim ini akan mendegradasi fitat menjadi inositol dan asam fosfat, sehingga akan meningkatkan ketersediaan fosfor bagi tubuh ternak (Rahmawati, 2005 dalam Andriyani 2014). Enzim fitase dapat dihasilkan oleh mikroorganisme (bakteri, jamur, yeast), jaringan hewan dan tanaman (Mizwar, 2003 dalam Andriyani 2014).

Fitase banyak dimanfaatkan dalam industri pangan dan pakan ternak. Adanya fitase pada bahan pangan manusia akan memudahkan dalam pencernaan asam fitat, sedangkan fitase pada bahan pakan ternak akan meningkatkan kualitas nutrisi pakan ternak dan mengurangi polusi fosfat.

Oh *et al.*, 2004 dalam Evy, 2012 membuat klasifikasi fitase berdasarkan analisis sekuens dan biokimia fitase. Fitase dikelompokkan menjadi dua kelas yaitu fitase alkalin dan fitase histidin, yang kemudian masih dapat dikelompokkan lagi menjadi 4 kelompok yaitu: PhyA, PhyB, PhyC dan PhyD. Kelompok fitase alkalin atau PhyD merupakan kelompok fitase yang dihasilkan oleh bakteri dari genus *Bacillus* yang memiliki pH optimum antara 7 - 8. Sedangkan kelompok fitase histidin yang dapat menghasilkan fitase yang berasal dari bakteri yaitu bakteri *E. coli* dari kelompok PhyC yang memiliki pH optimum antar 5,5 – 6.

G. Karakteristik Fitase

Bakteri tahan panas merupakan kelompok bakteri yang mampu tumbuh pada suhu 45°C sampai 65°C (Brock, 1986). Suhu di atas 60°C di alam bagi mikroorganisme terdapat pada daerah-daerah tertentu seperti daerah geotermal dan kompos.

Menurut Brock dan Madigan (1991) mikroba tahan panas memiliki beberapa keistimewaan diantaranya enzim dan protein yang dihasilkan bersifat termostabil dan mampu berfungsi optimal pada suhu tinggi. Kemampuan bakteri tahan panas untuk bertahan hidup di lingkungan panas disebabkan bakteri tersebut mempunyai membran sel yang kaya akan asam lemak jenuh dan membran ribosom yang juga tahan panas.

Organisme tahan panas merupakan organisme prokariot, karena organisme eukariot tidak dapat bertahan hidup pada suhu tinggi. Enzim fitase tahan panas yang memiliki efisiensi tinggi dalam katalitik, memiliki prospek ekonomi yang besar karena suplement pada pakan ternak yang mengandung fitase dapat meningkatkan ketersediaan fosfor dalam pakan tersebut. Misalnya fitase yang berasal dari *Aspergillus niger* yang memiliki suhu optimum 60°C, dan fitase yang berasal dari *Thermomyces lanuginosus* yang memiliki suhu optimum 69°C (Maheshwari *et al.*, 2000). Enzim fitase merupakan enzim induktif, dimana ketika suatu bakteri diinduksikan pada substrat yang mengandung fitat maka bakteri yang dapat menghidrolisis fitat akan membentuk zona bening yang merupakan indikator bakteri penghasil fitase. Induksi fitase tergantung pada dua hal, yaitu ketersediaan Na-Fitat atau Ca-Fitat dan tidak adanya fosfat anorganik dalam media (Kusumadjaja, 2009).

Berat molekul fitase bakteri pada umumnya lebih kecil daripada berat molekul fungi. Berat molekul bakteri berkisar antara 35-50 kDa, sedangkan berat molekul fitase fungi berkisar antara 65-70 kDa. pH optimum fitase bervariasi antara 2,2-8, fitase fungi memiliki pH optimum antara 4,5-5,6, *Bacillus* memiliki pH optimum 6,5-7,5, sedangkan pH optimum fitase pada tanaman antara 4,5-6. Temperatur optimum enzim fitase juga bervariasi (Kerouvo, *et al.*, 2000).

Genus *Burkholderia* tersebar luas diberbagai ekologi, namun paling banyak ditemukan dalam tanah dan menunjukkan interaksi *non-patogenic* terhadap tanaman. *Burkholderia* juga mampu melarutkan mineral dalam tanah dengan menghasilkan asam organik, serta meningkatkan ketersediaan nutrisi untuk tanaman sehingga

sangat menjanjikan untuk dimanfaatkan dalam bidang bioteknologi (Rambola et al. 2014). *Burkholderia* adalah genus bakteri endofit yang paling sering ditemui dan mampu menghasilkan senyawa bioaktif, salah satunya berpotensi sebagai senyawa antimikroba (Ryan et al., 2007).

Burkholderia lata merupakan bakteri Gram negatif yang berbentuk batang dan merupakan bakteri aerobik. Koloni bakterinya bersifat lembab serta berpigmen kuning dan terkadang ada yang berpigmen kuning-keunguan. Bakteri ini dapat tumbuh baik pada suhu 30°C-37°C dan tidak dapat bertahan pada suhu 40°C (Vanlaere, et al., 2009).

Klasifikasi dari bakteri *Burkholderia lata* adalah sebagai berikut:

Kingdom : Bacteria
Phylum : Proteobacteria
Class : Beta Proteobacteria
Order : Burkholderiales
Family : Burkholderiaceae
Genus : Burkholderia
Species : *Burkholderia lata* (Vanlaere, et al., 2009)

Burkholderia lata memiliki aktivitas oksidase dan lisin dekarboksilase, tetapi tidak ada aktivitas tryptophanase, arginin dihidrolase atau kegiatan urease dalam metabolismenya. (Vanlaere et al., 2009).

Dari beberapa laporan mengenai bakteri-bakteri dari genus *Burkholderia*, bahwa bakteri-bakteri dari genus *Burkholderia* tersebut mampu berasosiasi dengan

rhizospere tanaman dan bakteri dari spesies ini dilaporkan juga dapat berkontribusi untuk pertumbuhan tanaman dengan membebaskan fosfat dari senyawa organik tanah seperti asam fitat. Meskipun beberapa strain dari genus *Burkholderia* dilaporkan dapat mendegrasi asam fitat (Unno *et al.*, 2005). Akan tetapi hanya ada satu laporan yang melaporkan tentang karakteristik enzim fitase yang dihasilkan dari genus *Burkholderia* tersebut yaitu bakteri *Burkholderia* sp strain a13 (Graminho *et al.*, 2014).

Enzim murni yang dihasilkan oleh bakteri *Burkholderia* sp strain a13 menunjukkan aktivitas spesifik 174.1 U mg^{-1} . Enzim fitase yang dihasilkan dari bakteri tersebut adalah monomer. Kondisi optimal suhu dan pH bakteri *Burkholderia* sp strain a13 dalam menghasilkan enzim fitase adalah pada suhu $45\text{-}55^{\circ}\text{C}$ dan pH 4,5. Enzim fitase dapat stabil pada suhu 4°C (Graminho *et al.*, 2014).

Penelitian tentang bakteri *Burkholderia lata* dan pemanfaatannya masih sangat jarang dilakukan. Sampai saat ini belum pernah ada penelitian yang melaporkan bahwa *Burkholderia lata* dapat menghasilkan enzim fitase sehingga hasil penelitian ini memberikan bukti penemuan baru bahwa bakteri *Burkholderia lata* yang diisolasi dari tanaman jagung (*Zea mays* L.) bagian akar dapat menghasilkan enzim fitase (Harvianti, 2017).

H. Pemurnian enzim

Beberapa teknik analisis protein membutuhkan prosedur isolasi, yaitu memisahkan protein dari makromolekul lain atau memisahkan protein dengan sifat tertentu dari protein lain yang tidak diinginkan dalam analisis. Suatu teknik isolasi

dan identifikasi protein harus mempertimbangkan sifat-sifat fisik, kimiawi, dan kelistrikan suatu protein sehingga struktur dan aktivitasnya tidak berubah. Metode yang biasa digunakan untuk tahap awal isolasi adalah metode yang memiliki daya pemisah terendah seperti pengendapan dengan garam. (Suhartono dkk, 1992).

Pemurnian enzim bertujuan untuk memisahkan enzim yang dikehendaki dari enzim lain yang tidak diinginkan. Yang harus diperhatikan dalam pemurnian enzim yaitu kualitas enzim, untuk mempertahankan aktivitas enzim dan mengurangi proteolisis dan denaturasi (Natsir, 2010).

Enzim dapat dipisahkan dari sel yang memproduksinya dan dapat mempertahankan aktivitas katalitiknya walaupun sudah terpisah dari selnya, oleh karena itu kemungkinan untuk memperoleh enzim tertentu dari jaringan hewan, tanaman dan mikroba sangat besar (Lehninger, 1990 dalam Mari, 2014). Berdasarkan lokasinya di dalam sel, enzim hidrolitik dibedakan menjadi endoseluler (di dalam membran plasma) dan ekstraseluler (di luar membran plasma). Enzim ekstraseluler umumnya lebih diminati dalam industri karena dapat dipanen tanpa melibatkan tahap pemecahan sel (Dirnawan, 1999).

Setelah produk diperoleh atau disolasi dari sumbernya, maka tahap selanjutnya adalah pemurnian dengan berbagai metode yang sesuai seperti pengendapan, kromatografi, elektroforesis dan ultrafiltrasi. Metode pengendapan meluas digunakan untuk memperoleh protein (enzim) atau antibiotik. Penambahan garam untuk mengendapkan protein, oleh karena kelarutan protein berkurang dengan

bertambahnya konsentrasi garam dalam larutan. Pengendapan dengan garam lebih efektif dan relatif murah. (Zulmanwardi, 2012).

Garam-garam yang sangat efektif adalah garam-garam yang mengandung anion yang bermuatan banyak seperti sulfat, fosfat dan sitrat. Garam amonium sulfat paling banyak digunakan untuk mengendapkan protein. Pemurnian (pemekatan) protein menggunakan amonium sulfat adalah metode yang sering digunakan karena memiliki daya larut tinggi di dalam air, relatif murah, dan kestabilan protein di dalam larutan amonium sulfat tahan bertahun-tahun. Kelarutan protein (pada pH dan suhu tertentu) yang meningkat akan menaikkan konsentrasi garam (*salting in*). Penambahan garam dengan konsentrasi tertentu akan membuat kelarutan protein menurun (*salting out*). Molekul air yang berikatan dengan ion-ion garam akan menyebabkan semakin banyak terjadinya penarikan selubung air yang mengelilingi permukaan protein sehingga mengakibatkan protein saling berinteraksi, beragregasi, dan kemudian mengendap (Harris, 1989 dalam Dynnar, 2011).

Pemurnian enzim tidak menghendaki adanya kelebihan garam, oleh karena itu garam yang tersisa dari proses pengendapan dipisahkan dengan cara dialisis. Garam yang berlebih di dalam sampel dapat dihilangkan dengan cara menempatkan sampel di dalam kantung (membran) dialisis semipermeabel yang direndam di dalam larutan buffer. Molekul yang berukuran kecil akan keluar melalui membran, sedangkan molekul yang besar akan tertahan di dalam membran dialisis. Ukuran pori kantung dialisis yang terbuat dari bahan selulosa asetat ini dinyatakan dalam satuan dalton,

yang menunjukkan berat molekul minimum yang dapat tertahan didalam membran (Harris, 1989 dalam Dynnar, 2011).

Kebanyakan produk mikroba seperti antibiotik, asam-asam organik, pelarut, asam-asam amino dan enzim ekstraselular bersifat larut dan ekstrasel. Berbagai metode telah dikembangkan untuk mengekstrak produk-produk terlarut tersebut antara lain: ekstraksi, adsorpsi, ultrafiltrasi dan kromatografi (Zulmanwardi, 2012).

Saat ini telah dikenal metode kromatografi yang dalam penggunaannya dikenal sangat baik untuk memisahkan senyawa kimia tertentu dari sampel (Wonorahardjo, 2013). Kromatografi merupakan suatu teknik analisis biokimia berdasarkan metode pemisahan yang memerlukan waktu relatif singkat. Teknik ini pertama kali digunakan oleh Karl Runge pada tahun 1885, kemudian oleh Michael Tsweet pada tahun 1906 dalam pemisahan pigmen tanaman (Bintang, 2010 dan Wonorahardjo, 2013).

Pemisahan enzim dari protein lain dapat dilakukan secara kromatografi kolom dengan prinsip kerja pemisahan protein berdasarkan sifat fisik dan kimiawi. Kromatografi kolom adalah sebutan untuk semua jenis upaya pemisahan menggunakan kolom sebagai wadah fase diamnya. Pemisahan dan pemurnian suatu bahan terutama dilakukan dengan menggunakan salah satu dari beberapa teknik kromatografi ataupun menggunakan gabungan teknik-teknik tersebut (Bintang, 2010).

Setelah tahapan pemurnian dengan fraksinasi amonium sulfat, untuk mendapatkan enzim yang lebih murni lagi dilakukan dengan kromatografi filtrasi gel. Kromatografi gel merupakan pengembangan prinsip pemisahan kromatografi dimana

fase diam berupa gel permeabel dan dapat berfungsi sebagai penyaring. Kromatografi jenis ini digunakan untuk memisahkan senyawa-senyawa dengan berat molekul tinggi dalam penelitian biokimia dan kimia polimer. Gel sendiri merupakan jaringan tiga dimensi yang dibuat dengan *cross-linking* polimer rantai panjang yang dapat menyerap air dan pelarut-pelarut polar lain (Bintang, 2010).

Ada beberapa tipe gel yang digunakan dalam eksperimen biokimia, yang utama adalah gel sephadex. Gel sephadex merupakan suatu bahan yang tidak larut dan stabil dalam air, larutan garam, larutan organik, serta tidak terpengaruh oleh basa dan asam lemah (Bintang, 2010).

Perusahaan pharmacia membuat dextran saling berikatan silang. Tingkatan ikatan silang diatur dengan baik untuk fraksinasi molekul-molekul dengan kisaran ukuran molekul yang terbatas. Kisaran fraksinasi molekul hanya digunakan untuk perkiraan saja, karena besarnya selang fraksinasi dari pemisahan suatu molekul tergantung pada bentuk dan ukuran molekul. Sephadex G-25 dan G-50 dibuat dengan beberapa ukuran partikel mulai dari kasar, sedang, halus atau super halus. Huruf dan nomor menunjukkan bahwa sephadex tersebut dapat dikembangkan (*swelling*) dengan air atau larutan penyangga dengan besar pengembangan 50 kali (Bintang, 2010).

Gel atau matriks berpori ini dikemas di dalam kolom dan dielusikan dengan fase cair mobil. Prinsipnya yaitu larutan dialirkan di atas kolom yang berisi butir-butir gel. Butir-butir gel tersebut dikenal sebagai sephadex. Sampel yang mengandung campuran molekul besar dan kecil dilewatkan ke dalam kolom. Molekul protein yang

lebih kecil dapat menembus ke dalam pori-pori butiran dan karenanya tertahan selama aliran ke bawah kolom. Molekul protein yang besar tidak dapat menembus ke dalam pori-pori butiran dan melewati kolom lebih cepat (Setiawan, 2013 dalam Sahar, 2014).

Menurut (Bintang, 2010) Tingkatan ikatan silang diatur dengan baik untuk fraksinasi molekul-molekul dengan kisaran ukuran molekul yang terbatas. Hal ini digambarkan dalam beberapa gel sephadex :

Tabel 2.2 tipe-tipe sephadeks (Sumber: Bintang, 2010).

Tipe	Kisaran BM hasil fraksinasi		Air terikat (g/g gel kering)	Volume larutan pengembang (mL/g gel kering)
	Polisakarida (dalton)	Peptida dan protein		
G-10	1-700	1-700	1,0	2
G-15	$1-1,5 \times 10^3$	$1-1,5 \times 10^3$	1,5	3
G-25	$100-5,0 \times 10^3$	$1000-5,0 \times 10^3$	2,5	5
G-50	$500-1,0 \times 10^4$	$1500-3,0 \times 10^4$	5,0	10
G-75	$10^3-5,0 \times 10^4$	$3000-8,0 \times 10^4$	7,5	12-15
G-100	$10^3-1,0 \times 10^5$	$4000-1,5 \times 10^5$	10,0	15-20
G-150	$10^3-1,5 \times 10^5$	$5000-4,0 \times 10^5$	15,0	20-30
G-200	$10^3-2,0 \times 10^5$	$5000-8,0 \times 10^5$	20,0	30-40

Pemisahan biomolekul dengan kromatografi selalu melibatkan fase mobil dan fase stasioner. Fase mobil adalah larutan yang mengandung zat terlarut untuk

dipisahkan dan eluen yang membawa zat terlarut melewati fase stasioner. Fase stasioner merupakan adsorbent, resin penukar ion, padatan poros, gel yang biasanya dipacked di dalam kolom. Suatu larutan yang terdiri beberapa zat terlarut dimasukkan ke dalam kolom yang berisi fase stasioner, zat terlarut akan bergerak pada kecepatan tertentu melewati kolom dan terpisah, keluar dari kolom sebagai eluet. Tipe adsorben dan interaksi zat terlarut – adsorben disebut kromatografi adsorpsi, pertukaran ion, afinitas, dan filtrasi gel.

Menurut (Zulmanwardi, 2012) tahap-tahap utama yang terlihat dalam pemisahan dan purifikasi suatu produk fermentasi pada umumnya adalah;

1. Penghilangan partikel tak larut (*removal of solids*) dalam hal ini adalah sel dengan cara sentrifugasi atau filtrasi.
2. Isolasi primer produk atau pemekatan dan penghilangan molekul air.
3. Penghilangan atau purifikasi produk fermentasi dari bahan-bahan kimia pengkontaminasi, termasuk dalam tahap ini adalah presipitasi.
4. Preparasi produk seperti pengeringan atau penghilangan pelarut organik.

Peningkatan konsentrasi dan purifikasi (%) dalam industri farmasi yang dihasilkan dari proses fermentasi terlihat pada tabel dibawah ini:

Tabel 2.3 Tingkat kemurnian produk fermentasi pada berbagai proses pemisahan

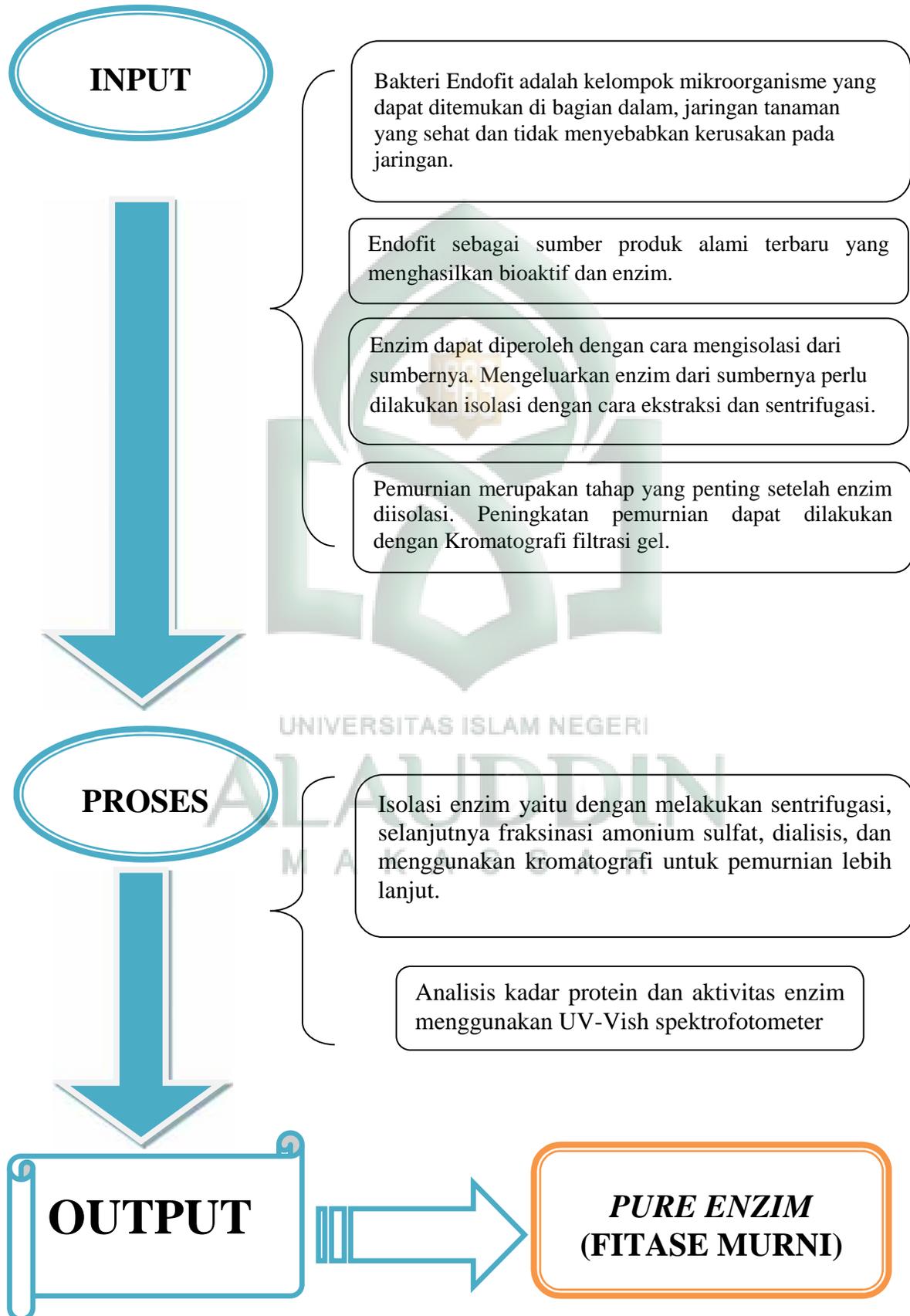
(sumber: Zulmanwardi, 2011).

Tahapan proses	Produk	
	Konsentrasi, g/l	Kemurnian
Kaldu	0,1 – 5	0,1 – 1,0

Filtrasi	0,1 – 5	0,1 – 2,0
Isolasi	5,0 – 10	1,0 – 10
Pemurnian	50 – 200	50 – 80
Kristalisasi	-	90 – 100



I. Kerangka Pikir



BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Jenis dan Pendekatan Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian kualitatif dengan pendekatan deskriptif. Model penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan enzim fitase murni menggunakan kromatografi filtrasi gel sephadexs G-100.

B. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan April-Mei 2017. Lokasi penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bioteknologi terpadu Fakultas Peternakan, Universitas Hasanuddin dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar.

C. Variabel Penelitian

Penelitian ini menggunakan variabel tunggal yaitu enzim fitase dari bakteri endofit asal tanaman Jagung (*Zea mays*) yang dimurnikan menggunakan kromatografi filtrasi gel sephadexs G-100.

D. Definisi Operational Variabel

Adapun definisi operasional variabel, antara lain:

1. Penelitian ini menggunakan bakteri *Burkholderia lata* strain HF yang merupakan bakteri endofit penghasil fitase akar tanaman jagung (*Zea mays*). Bakteri endofit

adalah bakteri yang hidup di dalam jaringan tumbuhan tanpa menyebabkan efek negatif.

2. Pemurnian dengan menggunakan kromatografi kolom dengan bahan filtrasi gel sephadex G-100 adalah metode pemisahan molekul berdasarkan perbedaan ukuran dengan melewatkannya ke dalam suatu kolom yang berisi partikel gel dengan ukuran berat molekul yaitu 4-150 kDa.

3. Aktivitas enzim fitase merupakan penentuan jumlah enzim yang mengkatalisis pembentukan 1 μmol fosfat anorganik per menit pada kondisi pengujian.

E. Instrumen Penelitian (Alat dan Bahan)

1. Alat

Alat yang digunakan adalah, oven, stirer dan magnetik stirer, UV vish spektrofotometer, neraca analitik, kuvet, sentrifuge, lemari pendingin, *ice box*, tube, mikropipet 1000 μ , 200 μ dan 100 μ , kromatografi kolom, erlenmeyer, pinset, spatula, botol vial, gelas kimia, tabung reaksi, statif, pH meter, pipet tetes, tip, sarung tangan, masker.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kultur biakan *Burkholderia lata* strain HF penghasil fitase dari bakteri endofit akar tanaman jagung (*Zea mays*), *Phytase Production Medium* (PPM), amonium sulfat, membran selofan, buffer Tris (hidroksimetil), buffer tris-HCl, buffer tris-HCl + NaCl, buffer tris-HCl + CaCl₂, gel sephadex G-100, aquadest, Tricloroasetat (TCA), amonium molibdat, larutan fosfat standar, Ca-Fitat, aluminium foil, coomasie brilian blue (CBB) G-250, etanol 95%,

asam fosfor 85%, *Bovine serum albumin* (BSA), reagen warna besi sulfat-molibdat, KH_2PO_4 , karet gelang, label, es kristal dan *tissue*.

F. Prosedur Kerja

1. Isolasi Ekstrak Kasar Enzim

Media optimasi produksi enzim fitase yang diperoleh dari hasil penelitian sebelumnya dilakukan sentrifugasi 5000 rpm selama 35 menit pada suhu 4° C untuk memisahkan cairan medium hasil kultur dengan massa sel. Supernatan yang diperoleh merupakan *Phytase Crude extract* (Ekstrak kasar fitase). Enzim kasar tersebut kemudian dianalisis kadar protein dan aktivitas enzimnya (Kusumadjaja, 2009, Hussin A. S. M. *et al.*, 2012., El-Touky *et al.*, 2013., Singh NK *et al.* 2013., dan Muthuraman *et al.*, 2013).

2. Pra Pemurnian (Fraksinasi Amonium Sulfat)

Ekstrak kasar fitase yang diperoleh dari hasil sentrifugasi disimpan pada *beaker glass* kemudian ditempatkan pada wadah dingin (*ice salt bath*) dan ditambahkan amonium sulfat sedikit demi sedikit sambil diaduk hingga kejenuhan 0-20% lalu didiamkan semalam pada suhu 4° C. Endapan yang terbentuk dipisahkan dengan cara sentrifugasi pada 10.000 rpm selama 30 menit. Hal yang sama dilakukan kejenuhan 20-40%, 40-60%, dan 60-80%. Endapan yang terbentuk dilarutkan dalam buffer Tris-HCl pH 7,8 (Ali *et al.*, 2015, Thyagarajan *et al.*, 2014). Pada tiap fraksi dilakukan uji aktivitas enzim fitase dan kadar protein. Fraksi yang memiliki aktivitas spesifik tertinggi dimurnikan lebih lanjut melalui proses dialisis.

3. Dialisis

Larutan enzim hasil fraksinasi amonium sulfat dimasukkan ke dalam kantung selofan kemudian dicelupkan ke dalam suatu bejana yang berisi akuades secukupnya. Bejana dialisis ditempatkan diatas pengaduk magnet yang dipasang dengan kecepatan rendah. Dialisis dilakukan selama 48 jam dengan cara mengganti larutan beberapa kali dengan larutan buffer Tris-HCl pH 7,0 (Thyagarajan *et al.*, 2014, Alzahrani, 2009). Dilakukan uji kadar protein dan aktivitas enzim fitase fraksi enzim hasil dialisis.

4. Pemurnian lebih lanjut dengan Kromatografi

a. Kromatografi filtrasi gel

1. Metode kromatografi filtrasi gel menggunakan matriks sephadex G-100 dengan cara sebagai berikut: sebanyak 2 gram sephadex G-100 dilarutkan dalam *aquadest* sampai melewati batas bubuk, kemudian distirrer selama 2 jam. Didekantasi beberapa menit sampai terbentuk 2 fase yakni *aquadest* dan gel. Fase *aquadest* dikeluarkan hingga hanya fase gel yang tersisa. Ditambahkan buffer Tris-HCl pH 7 sebanyak 2x volume dari fase gel. Kemudian distirrer selama 1 jam lalu dikembangkan semalam pada suhu 4°C. Selanjutnya matriks dicuci dengan buffer Tris-HCl pH 7. Secara perlahan matriks sephadex G-100 dimasukkan ke dalam kolom kromatografi berdiameter 1,5 cm dan tinggi 30 cm. Sampel fraksi enzim terbaik hasil dialisis dimasukkan kedalam kolom secara perlahan. Setelah semua sampel enzim masuk ke dalam matriks, ditambahkan Tris-HCl 0,1 M pH 7,0 sebanyak 45 mL, lalu Tris-HCl +NaCl sebanyak 45 mL,

kemudian Tris-HCl + NaCl + CaCl₂ sebanyak 45 mL. Kemudian ditentukan kecepatan air eluen 0,3 mL/menit sampai tertampung 45 fraksi. Setiap fraksi yang tertampung diukur kadar protein dan aktivitas enzimnya. Pengukuran kadar protein dilakukan dengan metode Bradford. Absorbansi diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm sedangkan untuk aktivitas enzim dengan membuat larutan standar fosfat dari KH₂PO₄ (Muthurama *et al*, 2013 dan Shimizu, 1992).

5. Penentuan kadar protein dengan metode Bradford

a. Pembuatan reagen Bradford

Ditimbang 0,1 g *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) G-250 kemudian dilarutkan dalam 50 ml etanol 96 % (v/v), lalu ditambahkan 100 ml asam fosfat 85% (v/v). dan diencerkan mencapai 1 liter. kemudian campuran dihomogenkan sampai merata lalu disaring dengan kertas saring, penyaringan diulang beberapa kali untuk memisahkan komponen pereaksi yang berwarna biru. Pereaksi Bradford harus berwarna coklat muda bening dan di simpan dalam botol gelap pada suhu rendah 4°C (Bintang, 2010).

b. Pengukuran kurva standar protein

Ditimbang 0,01 g *Bovine Serum Albumin* (BSA) kemudian dilarutkan dengan 10 ml aquadest steril lalu divorteks untuk menghomogenkan sehingga diperoleh larutan induk BSA artinya sudah konsentrasi 1000 ppm. Untuk membuat konsentrasi 100 ppm, Larutan induk diencerkan diambil 0,5 ml dan ditambahkan 4,5 ml aquadest steril sehingga diperoleh larutan stok BSA 100 ppm. Dari larutan stok tersebut dibuat

lagi deret standar protein dengan konsentrasi 0, 5, 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm menggunakan rumus pengenceran $M1.V1 = M2.V2$ dimasukkan dalam tabung yang berbeda, Kemudian masing-masing seri deret standar diambil 0.1 ml tabung yang berbeda lalu masing-masing ditambahkan 5 ml pereaksi Bradford, lalu divorteks dan didiamkan pada suhu ruang selama ± 10 menit. Pereaksi bradford memberikan efek warna biru untuk mendeteksi adanya protein dan di ukur absorbansinya pada spektrofotometer panjang gelombang 595 nm dan sebagai blanko adalah 0 ppm. Penentuan kurva standar menggunakan regresi linear, yang di dapatkan dari persamaan matematik larutan standar protein dan nilai absorbansi standar yang akan digunakan pengukuran kadar protein pada sampel.

c. Pengukuran sampel

Sampel diambil 0,1 ml enzim dan ditambahkan 5 ml reagen Bradford, lalu divortex dan didiamkan ± 10 menit. Absorbansi larutan sampel protein diukur pada panjang gelombang 595 nm dan dibuat blanko dari 0 ppm standar protein. Dengan persamaan matematik dari kurva standar protein, akan didapatkan kadar protein terlarut yang terkandung dalam larutan enzim.

6. Preparasi penentuan aktivitas fitase

a. Pembuatan reagen warna besi sulfat-molibdat biru

Pembuatan reagen ini dilakukan dengan cara membuat larutan yang berbeda:

1) Ditimbang 7,5 g amonium molybdat dilarutkan dalam 400 ml aquadest steril, kemudian dihomogenkan dan perlahan-lahan ditambahkan 22 ml asam sulfat (H_2SO_4), lalu diencerkan mencapai 500 ml dengan aquadest steril sehingga terbentuk

warnanya hijau (stok amonium molybdat). 2) ditimbang 2,7 g FeSO_4 dilarutkan dalam 100 ml aquadest steril sehingga terbentuk warna kuning (Stok Besi Sulfat). Masing larutan di simpan pada botol gelap dan suhu rendah 4 °C sampai 1 bulan. Pembuatan pereaksi warna molybdat kedua larutan dicampur amonium molibdat dan besi sulfat dengan perbandingan 4:1 (Muthurama *et al*, 2013 dan Shimizu, 1992).

b. Pengukuran kurva standar fosfat

Ditimbang 0,3834 g kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4) di larutkan dalam 100 ml aquadest steri sebagai larutan induk dengan konsentrasinya 1000 ppm. Kemudian encerkan lagi dalam 100 kali. Jadi 10 ml larutan induk diencerkan dengan aquadest steril mencapai 100 ml sebagai larutan standar dengan konsentrasi 10 ppm mengandung 0,03834 g.

Setiap kurva standar dibuat dengan diambil 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, dan 4 ml larutan fosfat standar, masing-masing dimasukkan dalam setiap labu erlenmeyer kemudian ditambahkan 6,25 pereaksi warna molybdat. Larutan dihomogenkan dan didiamkan selama ± 10 menit pada suhu ruang. Lalu masing-masing diencerkan dengan aquades steril sampai volume mencapai 25 ml. kemudian ukur absorbansi pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 700 nm

c. Pengukuran aktivitas enzim

Aktivitas enzim secara rutin diukur dengan menginkubasi 150 μl enzim dengan 600 μl 2 mM na-fitat dalam 0,1 M buffer Tris-HCl pH 7,0 dilengkapi dengan 2 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan diinkubasi selama ± 30 menit pada suhu 37°C, reaksi dihentikan dengan menambahkan 750 μl 5% Trikloroasetat (TCA) dan pelepasan *inorganic*

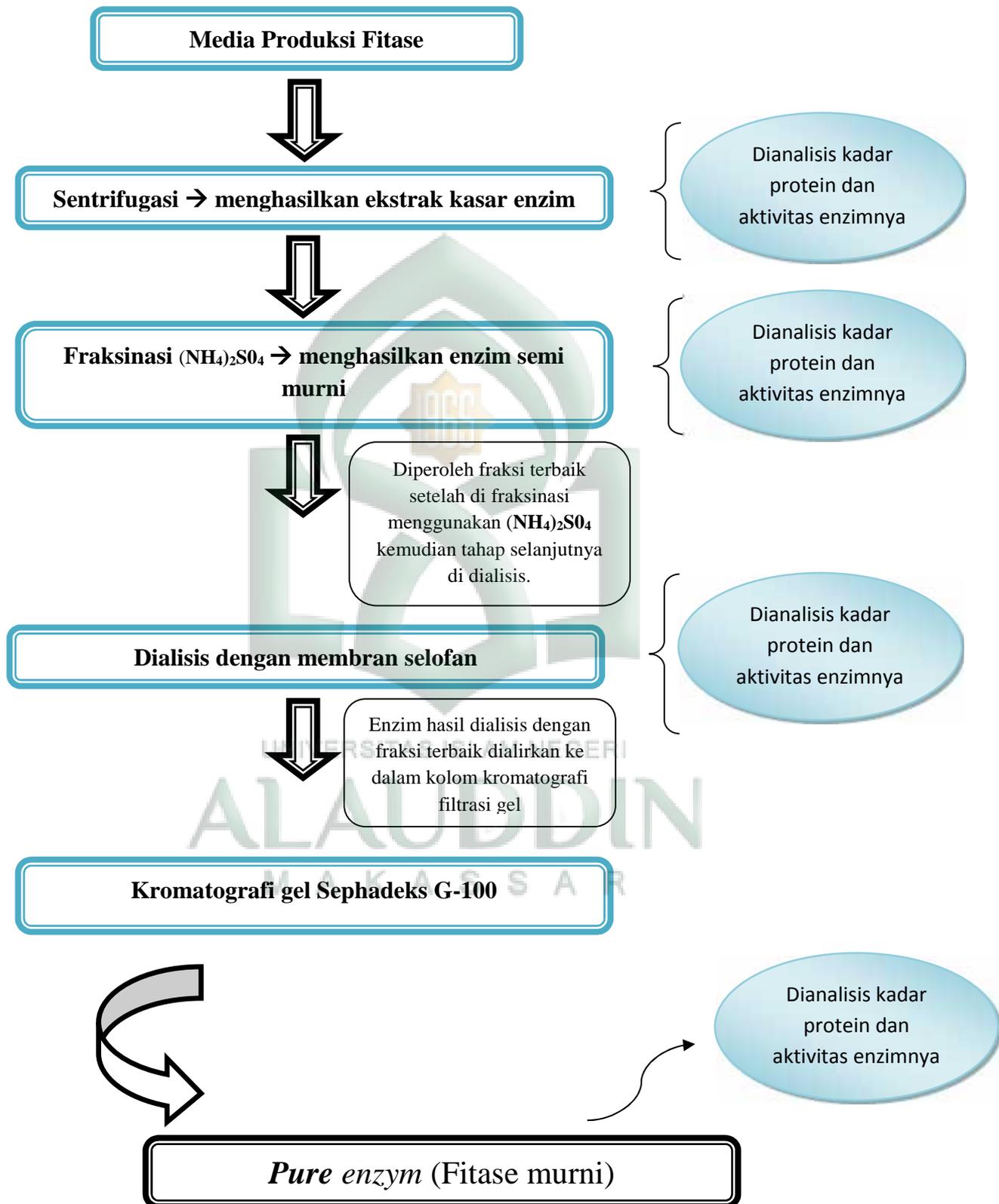
orthophosphate (Pi) secara fotometri diukur pada 700 nm dengan menambahkan 1,5 mL pereaksi molibdat-vanadat. Aktivitas enzim dinyatakan dalam unit/mL. Satu unit aktivitas enzim fitase didefinisikan sebagai sejumlah enzim yang dibutuhkan untuk melepaskan 1 μmol Pi per menit dibawah kondisi pengujian. Aktivitas spesifik enzim yaitu aktivitas enzim per mg protein (Shimizu, 1992., Muthuraman *et all*, 2013., Singh NK *et all*, 2013., El Toukhy, *et all*, 2013., dan Hussin, 2102).

G. Teknik pengolahan data

Pengolahan data penelitian disajikan dalam bentuk table dan grafik.



H. Skema kerja



BAB IV
HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Isolasi Ekstrak Kasar enzim

Adapun kadar protein dan aktivitas ekstrak kasar enzim disajikan dalam bentuk tabel sebagai berikut:

a. Penentuan Kadar Protein

Tabel 4.1 kadar protein *Crude enzyme*

No.	Fraksi Protein	Absorbansi	Kadar Protein (mg/mL)
1	<i>Crude enzyme</i>	0,056	61,9

b. Penentuan Aktivitas Enzim

Tabel 4.2 Aktivitas *Crude enzyme*

No.	Fraksi Protein	Absorbansi	Aktivitas Enzim (U/mL)
1	<i>Crude enzyme</i>	1,544	8,10

2. Pra Pemurnian (Fraksinasi Amonium Sulfat)

Penelitian ini menggunakan lima tingkat kejenuhan amonium sulfat yaitu 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% dan 80-100%. Adapun kadar protein dan aktivitas enzim setelah fraksinasi amonium sulfat adalah sebagai berikut:

a. Penentuan Kadar Protein

Tabel 4.3 Kadar protein tiap fraksi pengendapan Amonium Sulfat

No.	Fraksi Protein	Absorbansi	Kadar Protein (mg/mL)
1	0-20%	0,025	30,9
2	20-40%	0,170	175,9
3	40-60%	0,171	176,9
4	60-80%	0,097	102,9
5	80-100%	0,162	167,9

b. Penentuan Aktivitas Enzim

Tabel 4.4 Aktivitas enzim tiap fraksi pengendapan Amonium Sulfat

No.	Fraksi Protein	Absorbansi	Aktivitas Enzim (U/mL)
1	0-20%	1,623	8,52
2	20-40%	1,803	9,46
3	40-60%	1,840	9,65
4	60-80%	2,045	10,72
5	80-100%	2,561	13,42

3. Dialisis

Adapun kadar protein dan aktivitas enzim setelah di dialisis adalah sebagai berikut:

a. Penentuan Kadar Protein

Tabel 4.5 Kadar protein tiap fraksi pengendapan Amonium Sulfat setelah Dialisis

No.	Fraksi Protein	Absorbansi	Kadar Protein (mg/mL)
1	0-20%	0,453	458,9
2	20-40%	0,157	162,9
3	40-60%	0,262	267,9
4	60-80%	0,138	143,9
5	80-100%	0,159	164,9

b. Penentuan Aktivitas Enzim

Tabel 4.6 Aktivitas enzim tiap fraksi pengendapan Amonium Sulfat setelah Dialisis

No.	Fraksi Protein	Absorbansi	Aktivitas Enzim (U/mL)
1	0-20%	1,461	7,67
2	20-40%	1,169	6,14
3	40-60%	1,516	7,96
4	60-80%	1,637	8,59
5	80-100%	1,036	5,44

4. Pemurnian menggunakan kromatografi Filtrasi Gel sephadeks G-100

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, yaitu pemurnian fitase menggunakan kromatografi filtrasi gel sephadeks G-100 maka diperoleh hasil aktivitas enzim fitase dan kadar protein sebagai berikut:

Tabel 4.7 Nilai Aktivitas dan Kadar Protein tiap Fraksi pemurnian Kromatografi Filtrasi Gel Sephadexs G-100

Fraksi	Kadar protein (mg/mL)	Aktivitas enzim (U/mL)
F1	0,000	0,000
F2	0,000	0,000
F3	20,9	6,32
F4	19,9	6,50
F5	33,9	6,34
F6	37,9	6,17
F7	25,9	6,39
F8	22,9	6,44
F9	26,9	6,82
F10	29,9	6,78
F11	36,9	6,75
F12	28,9	6,65
F13	27,9	6,60
F14	17,9	6,74

F15	13,9	6,68
F16	10,9	6,81
F17	0,000	0,000
F18	0,000	0,000
F19	0,000	0,000
F20	0,000	0,000

Tingkat Kemurnian Fitase dari Bakteri *Burkholderia Lata* strain 383

Menggunakan Filtrasi gel sephadeks G-100

Tabel 4.8 Tingkat Kemurnian Fitase dari Bakteri *Burkholderia Lata* strain 383 Menggunakan Filtrasi gel sephadeks G-100 dibandingkan ekstrak kasar enzim

NO	Fraksi Protein	Vol. Setiap Fraksi (mL)	Kadar protein (mg/mL)	Total Protein (mg)	Aktivitas Fitase (U/mL)	Total Fitase Se (Unit)	Aktivitas Spesifik (U/mg)	Kemurnian* (X)
1.	<i>Crude enzyme</i>	900	61,9	55.710	8,10	7.270	0,1	1,0
2.	G-100 (F9)	3	26,9	81	6,82	20,46	0,3	3,0

Keterangan: *) = kemurnian fitase dibandingkan dengan crude enzim
X) = kali lipat

B. Pembahasan

Proses pemurnian fitase dalam penelitian ini yaitu diawali isolasi ekstrak kasar enzim (*Crude enzyme*) dengan sentrifugasi, 2) Pra pemurnian (Fraksinasi amonium sulfat), 3) dialisis dan 4) Pemurnian menggunakan kromatografi filtrasi gel sephadeks G-100. Adapun pembahasan tersebut diuraikan sebagai berikut:

1. Isolasi Ekstrak Kasar Enzim

Media optimasi produksi fitase yang digunakan berdasarkan hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh (Maslan, 2017) menggunakan media fermentasi PPM yang dimodifikasi dengan variasi sumber fitat. Hasilnya, media optimum yang diperoleh yaitu kedelai-pepton yang memiliki kadar protein dan aktivitas enzim tertinggi.

Umumnya, tahapan isolasi enzim adalah ekstraksi dan sentrifugasi. Pemisahan organel dan molekul penyusunnya dapat dilakukan dengan menggunakan sentrifuga dengan kecepatan dan lama sentrifugasi tertentu (Yuwono, 2005). Dengan sentrifugasi, debris dan organel sel akan mengendap di dasar tabung sentrifuga (dinamakan pellet), sedangkan makromolekul termasuk protein yang ukurannya jauh lebih kecil dari pada debris dan organel sel tidak akan mengendap tetapi terlarut dalam buffer (dinamakan supernatant). (Fatchiyah, 2011). Isolasi ekstrak kasar enzim pada penelitian ini menggunakan kecepatan sentrifugasi 5000 rpm selama 35 menit pada suhu 4° C untuk memisahkan cairan medium hasil kultur dengan massa sel, karena enzim fitase ini bersifat ekstraseluler sehingga tidak diperlukan untuk melisis dinding sel bakteri dan isolasi fitase dapat langsung dilakukan dengan sentrifugasi media hasil kultur. Karena protein merupakan kelompok biomakromolekul yang mudah rusak bila tidak berada dalam kondisi fisiologisnya, Oleh karena itu untuk mempertahankan struktur dan fungsi protein, isolasi ekstrak kasar enzim dilakukan pada suhu 4°C. setelah sentrifugasi, supernatan yang diperoleh masih mengandung makromolekul

lain yang berasal dari media kultur sehingga disebut *Phytase Crude extract* (Ekstrak kasar fitase). Ekstrak kasar yang diperoleh diukur aktivitas dan kadar proteinnya, data aktivitas enzim dan kadar protein diperoleh dengan cara mensubstitusikan absorbansi pada persamaan matematik regresi linear hasil dari kurva standar. Hasil pengukuran aktivitas ekstrak kasar kasar enzim memiliki aktivitas spesifik sebesar 0,1 (U/mg) (Tabel 4.8).

2. Fraksinasi Amonium Sulfat

Untuk menganalisis protein yang ada di dalam sel, diperlukan prosedur fraksinasi sel yaitu memisahkan sel, menghancurkan membran sel untuk mengambil kandungan sitoplasma dan organelnya, serta memisahkan organel-organel dan molekul penyusunnya (Fatchiyah, 2011). Pada penelitian ini dilakukan fraksinasi menggunakan garam amonium sulfat karena garam-garam yang sangat efektif adalah garam-garam yang mengandung anion yang bermuatan banyak seperti sulfat, fosfat dan sitrat. Garam amonium sulfat paling banyak digunakan untuk mengendapkan protein. Pemurnian (pemekatan) protein menggunakan amonium sulfat adalah metode yang sering digunakan karena memiliki daya larut tinggi di dalam air, relatif murah, dan kestabilan protein di dalam larutan amonium sulfat tahan bertahun-tahun (Harris, 1989 dalam Dynnar, 2011).

Fraksinasi dilakukan pada lima tingkat kejenuhan amonium sulfat yaitu 0-20 %, 20-40 %, 40-60 %, 60-80 % dan 80-100 % kemudian dilakukan pengukuran kadar protein dan aktivitas fitase pada masing-masing fraksi (endapan). Kadar protein tertinggi terdapat pada kejenuhan 80-100% yaitu 167,9 mg/mL. Menurut

Chaplin (2004), protein yang mengandung asam-asam amino hidrofobik akan mengendap pada konsentrasi garam yang lebih rendah dibandingkan protein yang mengandung asam-asam amino hidrofilik. Hal tersebut dikarenakan pada tingkat kejenuhan garam amonium sulfat 0-20% ion-ion garam amonium sulfat berikatan dengan molekul air, sedangkan protein yang mengandung asam amino hidrofobik paling banyak akan mengendap. Protein yang mengandung asam amino hidrofilik tidak akan mengendap dan berada pada filtrat. Protein yang bersifat lebih hidrofilik akan mengendap jika sudah berada pada tingkat kejenuhan garam tertinggi (80-100%). Semakin banyak molekul air yang berikatan dengan ion-ion garam akan menyebabkan penarikan molekul air yang mengelilingi permukaan protein. Peristiwa ini mengakibatkan protein saling berinteraksi, teragregasi, dan mengendap. Berdasarkan hasil penelitian, protein yang paling banyak mengendap berada pada kadar amonium sulfat 80-100% yang mengandung asam amino yang bersifat lebih hidrofilik dibandingkan protein yang mengendap pada konsentrasi garam 0-20%. Hal tersebut berarti protein-protein yang terdapat pada *crude enzyme* setelah fraksinasi amonium sulfat mengandung asam amino yang bersifat hidrofilik dengan jumlah yang lebih banyak dibandingkan dengan protein-protein yang mengandung asam-asam amino hidrofobik.

Berdasarkan teori, asam amino yang dibagi ke dalam beberapa kelompok yang ditentukan oleh sifat kimiawi rantai sampingnya, yaitu terdapat kelompok pertama yang terdiri atas asam-asam amino yang memiliki rantai samping

hidrofobik yaitu: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Phe (F), Pro (P), dan Met (M) (Ngili, 2013).

3. Dialisis

Proses pemurnian lebih lanjut biasanya tidak menghendaki kelebihan garam, oleh karena itu dialisis bertujuan untuk menghilangkan molekul garam dan ion mengganggu lainnya yang turut mengendap bersama protein yang mempengaruhi aktivitas enzim (Natsir, 2010). Proses dialisis terjadi berdasarkan prinsip osmosis dan dilakukan pada suhu rendah agar protein tidak rusak dan tetap dalam keadaan stabil (Lehninger, 1993).

Dialisis menggunakan membran selofan sebagai membran yang akan melakukan dialisis dengan pori-pori yang lebih kecil dari molekul protein sehingga protein akan tertahan di dalam kantung dan molekul yang berukuran kecil seperti ion-ion akan lolos melalui kantung dan terpisah dari protein (Fitriana, 2012).

Larutan buffer yang digunakan di luar membran memiliki konsentrasi ion yang lebih rendah daripada konsentrasi di dalam kantung selofan. Dengan demikian molekul berukuran kecil seperti garam atau ion pengganggu lainnya akan melewati pori membran sampai konsentrasi di dalam dan di luar kantung selofan mencapai nilai yang sama atau terjadi keseimbangan (Natsir, 2010).

Pada tahap dialisis ini, menggunakan buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7 dimana konsentrasinya lebih rendah dibanding konsentrasi yang digunakan untuk melarutkan fraksi enzim yaitu buffer Tris-HCl 0,1 M pH 7. Pemilihan buffer pH 7 dinilai telah tepat karena sesuai dengan pendapat dari Whitaker (1994) dalam

Dynnar (2011) yang menyatakan bahwa sebaiknya menggunakan buffer untuk mengontrol pH dekat dengan 7,5 untuk menjaga kestabilan protein, dan juga sesuai dengan referensi yang dirujuk yang dalam pemurnian enzim fitase.

Hasil tiap fraksi pengendapan amonium sulfat tersebut dimurnikan lebih lanjut dengan cara dialisis. Tahap dialisis ini dilakukan selama enam hari dengan melakukan beberapa kali penggantian buffer. Tujuan dari penggantian larutan buffer ini agar ekstrak kasar enzim yang berada dalam kantong selofan tidak tercampur kembali dengan molekul garam amonium sulfat yang telah berdifusi keluar melalui membran selofan. Proses ini disertai dengan pengadukan menggunakan *magnetic stirrer*. Tujuannya agar buffer yang berada diluar membran tidak mengalami pengendapan. Selain itu, proses dialisis juga dilakukan pada suhu rendah ($0-4^{\circ}\text{C}$) yang berguna untuk mempertahankan struktur dan fungsi protein dalam hal ini enzim dan untuk menonaktifkan kinerja enzim sehingga enzim dalam keadaan *inaktif* dan agar struktur protein tidak rusak (terdenaturasi). Proses dialisis dihentikan apabila buffer sudah tidak mengalami perubahan warna dan tidak keruh. Untuk mengetahui bahwa dialisis telah selesai, buffer hasil dialisis diuji dengan BaCl_2 , apabila sudah tidak terbentuk endapan putih dan warna buffer tidak keruh, maka dialisis sudah dapat dihentikan. Hal ini menandakan bahwa garam amonium sulfat telah berdifusi keluar melalui membran selofan.

Hasil dialisis enzim dari fraksinasi amonium sulfat pada kejenuhan 60-80% yang menjadi dasar utama mengapa pada fraksi tersebut dijadikan sebagai fraksi

yang terbaik dan dipilih untuk dimurnikan menggunakan kromatografi filtrasi gel sephadexs G-100 karena memiliki aktivitas enzim tertinggi yaitu 8,59 U/mg di bandingkan fraksi-fraksi lainnya (fraksi 20-40%, 20-40%, 40-60%, 60-80% dan 80-100%) (Tabel 4.6).

4. Kromatografi Filtrasi gel sephadexs G-100

Proses pemurnian enzim fitase lebih lanjut menggunakan kromatografi filtrasi gel, yaitu Sebanyak 7,1 mL fraksi 60-80% dialirkan ke dalam kolom yang berisi matriks gel sephadexs G-100 yang terlebih dahulu dielusi menggunakan buffer Tris-HCl, selanjutnya dengan penambahan buffer Tris-HCl 45 mL, buffer Tris-HCl + NaCl 45 mL dan Tris-HCl + NaCl + CaCl₂ 45 mL kemudian menentukan kecepatan elusi 0,3 mL/menit, sebanyak 3 mL fraksi ditampung tiap botol vial hingga fraksi ke 45. Kemudian penentuan aktivitas enzim dilakukan dengan mensubstitusikan data hasil absorbansi enzim dengan kurva fosfat standar untuk menghitung posfor anorganik yang dilepaskan pada reaksi.

Pemisahan protein berdasarkan ukuran bisa dilakukan menggunakan teknik filtrasi gel. Teknik ini bergantung pada kemampuan molekul protein untuk berdifusi ke dalam pori-pori matriks gel dalam suatu kolom. Bahan gel yang biasa dipakai adalah dekstran (polimer dari glukosa) yang berbentuk butiran kecil yang dijual dengan nama komersial Sephadex, yang terdapat dalam berbagai ukuran pori-pori (Ngili, 2013). Pada tahap pemurnian enzim lebih lanjut ini, menggunakan kromatografi filtrasi gel sephadexs G-100.

Data hasil pemurnian menunjukkan profil elusi kromatografi filtrasi gel fitase dari *Burkholderia lata* strain 383 diperoleh fraksi terbaik yang menunjukkan aktivitas enzim yang tinggi, yaitu fraksi F9 dengan nilai aktivitas adalah 6,82 U/mL dengan kadar protein adalah 26,9 U/mg, sehingga menunjukkan aktivitas spesifik adalah 0,3 U/mg dengan tingkat kemurnian 3 kali lipat dari ekstrak kasar (Tabel 4.8).

Proses filtrasi gel ini menggunakan buffer Tris-HCl sebagai eluen. Sedangkan fase diam adalah sephadexs G-100. Berdasarkan teori bahwa sephadexs G-100 merupakan matriks yang dapat memisahkan molekul protein berdasarkan berat molekul yaitu 4-150 kDa (Suhartno, 1989). Protein dengan kisaran berat molekul tersebut akan memasuki pori matriks dan terikat kuat serta bergerak lebih lambat dalam kolom, sedangkan protein dengan berat molekul lebih kecil dari 4 dan lebih dari 150 kDa akan bergerak lebih cepat karena tidak tertahan dalam pori matriks. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tingkat kemurnian fitase dari bakteri *Burkholderia lata* strain 383 setelah melalui pemurnian menggunakan kromatografi filtrasi gel dengan matriks sephadexs G-100 meningkat kemurniannya yaitu (F9) 3 kali lipat dari ekstrak kasar enzim (*Crude enzyme*).

Implikasi

Penelitian ini dilandasi oleh QS. al-Anbiya'/21:16, yang di mana sudah seharusnya sebagai seorang ilmuwan muslim dalam melakukan riset, berpedoman kepada al-Qur'an dan al-sunnah. Berdasarkan penafsirannya, ayat ini menjelaskan bahwa semua yang diciptakan oleh Allah swt. memiliki tujuan yang benar

sebagaimana telah dilakukannya penelitian ini, memberikan penegasan bahwa keselarasan al-Qur'an dan sains modern ada niscaya, sehingga memberikan informasi kepada orang-orang yang berakal untuk senantiasa menjadikan al-Qur'an dan al-sunnah sebagai pedoman dalam hidupnya. Dengan penelitian ini, saya selaku peneliti berharap agar kita semua terutama diri saya pribadi agar dapat lebih meningkatkan ketakwaan kepada Sang Khalik dengan menjadikan riset sebagai alat bantu atau komunikasi dalam memahami al-Qur'an, juga dengan penelitian ini dapat meningkatkan *akhlaqul karimah* yaitu dengan memberikan informasi yang bermanfaat kepada masyarakat yang bergelut dalam dunia peternakan agar mengaplikasikan enzim fitase pada pakan ternak untuk meningkatkan produktifitas hewan ternak. Juga, menjadikan kita sebagai mahasiswa/mahasiswi yang bertindak sebagai pencerah di masyarakat, *In sya Allah Aamiin.*

BAB V

PENUTUP

A. Kesimpulan

Adapun kesimpulan dari penelitian ini adalah fitase dari bakteri *Burkholderia lata* strain 383 endofit asal tanaman jagung (*Zea mays*) setelah melalui pemurnian menggunakan kromatografi filtrasi gel dengan matriks sephadexs G-100 diperoleh fraksi terbaik yaitu F9 dengan aktivitas spesifik enzim 0,3 U/mg dengan tingkat kemurnian enzim 3 kali lipat lebih murni dari ekstrak kasar enzim (*Crude enzyme*).

B. Saran

Adapun saran yang ingin saya sampaikan dengan maksud mengembangkan hasil penelitian, maka perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang:

1. Mengaplikasikan fitase dalam pembuatan pakan ternak komersial sehingga kurangnya penyerapan nutrisi terutama untuk ternak monogastrik dapat teratasi.
2. Karakterisasi enzim fitase berdasarkan pengaruh suhu, pengaruh pH, konsentrasi substrat, waktu inkubasi dan pengaruh ion logam seperti Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , terhadap aktivitas aktivitas fitase serta penentuan berat molekul enzim menggunakan metode SDS-PAGE.
3. Metode yang digunakan untuk memperoleh enzim yang lebih murni lagi sehingga meningkatkan aktivitas enzim dapat dilanjutkan dengan menggunakan

kromatografi ion *exchange*, ataupun menggunakan metode HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*).



KEPUSTAKAAN

al-Qur'an al-karim

Akhmetova, *et al.*, "Isolation and Characterization of a New Bacillary Phytase"
Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 39 no. 4 (2013): h.384–389.

Aly, Magda. Tork Sana. Al-Garni Saleh. "Production and Characterization of Phytase from *Stereptomices R10* Isolated from Decaying Wood Samples"
International Journal of Agriculture and Biology 17 no. 3 (2015): h. 515-522.

Alzahrani, Z. *Salting In, Salting Out, and Dialysis of Proteins*, Departement of Biochemistry of Science KSU, 2009.

Amelia, Roawita. "Karakterisas Isolat Bakteri Penghasil Fitase Asal Kutu Jagung (*Sitophilus zeamays*)". *Tesis*. Bogor: Program Studi Bioteknologi Sekolah Pascasarjan Institut Pertanian Bogor, 2010.

Andriyani. Sajidan., Artini "isolasi dan cloning gen penyandi fitase *Bacillus sp* EN 6" *el-vivo* 2 no.1 (April 2014) h.1-9

Bintang, Maria. *Biokimia teknik penelitian*, Jakarta: Erlangga, 2010.

Boyce, A., Casey, A., and Walsh, G., "phytate degrading" 2004, *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, 32, 336-340.

Bregman AN, Futon C. *Enzyme Technology*. New York: Springer Science Business Media, 1996.

Buxbaum E. *Fundamental of Protein Structure and Function*. New York: Indah, m. *Enzim. Fakultas kedokteran Universitas Sumatera Utara*, 2004.

Chaplin, M.F., Bucke C., *Enzyme Technology*, 85-86, Cambridge Univ. Pr., New York, 1990.

Dalam Keadaan Anaerob" Bogor: *IPB Press*, 2009.

Dirnawan, H., Isolasi bakteri termofil penghasil enzim hidrolitik ekstraseluler dari sumber air panas gunung Pancar IPB Bogor.

Dynnar, Nico. "Pemurnian dan Karakterisasi Enzim Katepsin dari Ikan Bandeng (*Chanos Chanos* Forskall)". *Skripsi*. Bogor: Departemen Teknologi Hasil

- Perairan Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor, 2011.
- El-Thouky, Nabil. Youssef, Amany and Mikhail, Mariam “Isolation, Purification, and Characterization of Phytase from *Bacillus subtilis* MJA” *African Journal of Biotechnology* 12 no.20 (Mei 2013): h:2598-2967.
- Fatchiyah dkk, *Biologi Molekuler Prinsip dasar dan Analisis*. Jakarta: Elangga, 2011.
- Fitriana. Purifikasi partial dan karakterisasi Endoglukanase dari *Trichoderma viride* pada fermentasi menggunakan substrak dedak padi. Skripsi: Fakultas matematika dan ilmu pengetahuan alam jurusan kimia, Universitas Indonesia, 2012.
- Graminho, Eduardo Rezende, Naoki Takaya, Akira Nakamura,* and Takayuki Hoshino. urification, biochemical characterization, and genetic cloning of the phytase produced by Burkholderia sp. strain a13. *J. Gen. Appl. Microbiol* 61 (2015):15–23.
- Hidayat, Cecep., Sumiati., Sofjan ”Persentase Bobot Karkas dan Potongan Komersial Ayam Sentul-G3 yang Diberi Ransum Mengandung Dedak Tinggi dengan Supplementasi Fitase dan ZnO ”. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia (JIPI)*, 20 no.2 (Agustus 2015) p. 132
- Hussin, A. S. M. et al. Optimization Of Cultivation Condition For The Production Of Phytase-Degrading Enzumes By Enterobacter Sakazakii ASUIA279 Isolated Form Malaysia Maize Root. Malaysia: *journal of Biotechnology and Biodiversity* 3 no. 2 (may 2012): pp. 1-10.
- Indarwati, Sri. “Isolasi dan Modifikasi Media Produksi Bakteri Penghasil Fitase”. *Skripsi*. Bogor: Program Studi Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor, 2000.
- Irianingrum, Retno. “Kandungan Asam Fitat Dan Kualitas Dedak Padi Yang Disimpan Dalam Keadaan Anaerob”. *Skripsi*. Bogor: Program Studi Peternakan Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor. 2009.
- Kerovuo, J. A novel phytase from Bacillus: Characterization and production of the enzyme, *Ph.D dissertation*, University Helsinki, Finland, 2000.
- Kim, O.H, Kim Y.O, Shim J.H, Jung Y.S, Jung W.J, Choi W.C, Lee H, Lee S.J, Auh J.H and Kim K.K. -Propeller phytase hydrolyzes insoluble Ca²⁺-phytate salts and completely abrogates the ability of phytate to chelate metal ions. *J.Biochemistry* 49: 10216–10217, 2010.
- Kuchel P dan Gregory BR. *Biokimia*. Jakarta: Penerbit Erlangga, 2006.

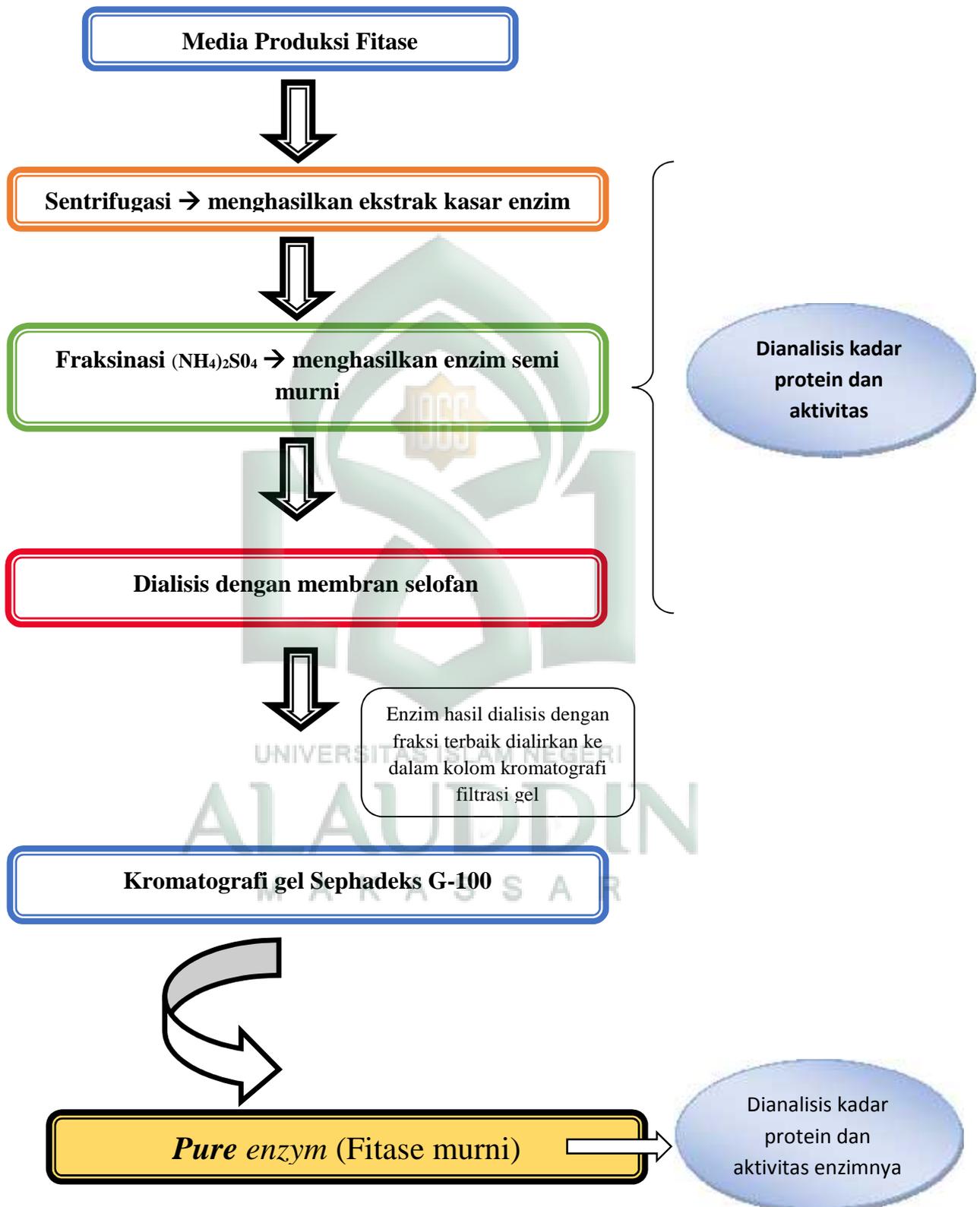
- Kurnia, D. R. D., Studi Aktivitas Lipase dari *Aspergillus niger* sebagai Biokatalis pada Proses Gliserolisis untuk Menghasilkan Monoasilgliserol (Tesis), Universitas Diponegoro, Semarang, 2010.
- Kusumadjaja, A. P, Tutuk B, Ni Nyoman T. P, dan Sajidan. "Screening Mikroorganisme Termofilik Penghasil Enzim Fitase yang Tumbuh Di Kawah Ijen Banyuwangi". *Indo. J. Chem.* 9 no. 3 (2009): h. 500-504.
- Kusumadjaja, Aline Puspita. Penapisan, Karakteristik Fitase dan Analisis Homologi Gen Penyandi Fitase dari Bakteri Termofilik Kawah Ijen Bayuwangi. Surabaya: *Disertasi* Surabaya: Program Pascasarjana Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Airlangga, 2009.
- Lehninger, J.L Dasar-dasar biokimia, Erlangga, Jakarta, 1990.
- Lehninger AL. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jilid I. M. Thenawidjaja, penerjemah. Jakarta: Erlangga. Terjemahan dari: *Principle of Biochemistry*, 1993.
- Lima-Filho, G.L., U.C. Aroujo, G.M.T. Lima, L.C.M. Aleixo, S.R.F. Moreno, S.D. Santos-Filho, R.S. Freitas, M.V. Castro-Faria, and M. Bernardo-Filho.. *A new in vitro enzymatic methode to evaluate the protective effect of phytic acid againts copper ions*. *Pakistan J. Nutr.* 3 (2004): h. 118-121
- Liu, Bing-Land. Amjad Rafiq, Yew-Min Tzeng and Abdul Rob. 1998. *The induction and characterization of phytase and beyond*. Institute of Biotechnology, National Dong Hwa University, Shoufeng, Taiwan and Department of Biological and Chemical Science, University of Essex, Colchester, United Kingdom.
- Liu., Cadogan.Dj ., Truang " effect of phytase supplementation on growth performance nutrient utilization and digestive dynaic of starch and protein in broiler chicken offered maize sorghum and whaet base diet" *Animal Feed scien and technology* no.12 (2014) h.1-12
- Maenz, D.D, Classen H.L. Phytase activity in the small intestinal brush border membrane of the chicken. *Poult Sci* 77 (1998): h. 557-563.
- Natsir, Hasnah. "Kajian enzim kitinase termostabil dari bakteri termofil: produksi, pemurnian, karakterisasi dan aplikasi dalam hidrolisis kitin". *Disertasi*. Makassar. Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin Makassar, 2010.
- Ngili, Dr. Yohanis. *Protein dan Enzim*. Bandung: Rekayasa Sains, 2013.
- Novita Sari, Evy. 2012. Identifikasi Bakteri Penghasil Fitase Berdasarkan Gen 16s Rrna Dan Karakterisasi Fitase dari Kawah Sikidang Dieng. *Tesis*. Surakarta: Program Pascasarjana Universitas Sebelas Maret.

- Nuhriawangsa, Adi Magna Patriadi. Produksi Serbuk Fitase Hasil Teknologi Rekombinan dan Aplikasinya untuk Meningkatkan Kualitas Pakan dan Kinerja Ayam Broiler. *Disertasi*. Yogyakarta: UGM, 2012.
- Nurjannah. “Aktivitas fitase termotabil bakteri termofilik dari sumber air panas Sulili Kabupaten Pinrang Sulawesi Selatan”. *Skripsi*. Makassar: Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam negeri Alauddin, 2013.
- Octarya, Zona ., Sumaryati Syukur2 ., Endang Purwati ., “Purifikasi Parsial Enzim Ekstraseluler (*Anoxybacillus* sp.) yang Diisolasi dari Sumber Air Panas Bukit Kili Solok serta Aplikasinya untuk Menghidrolisis Limbah Berserat” *Jurnal Natur Indonesia* 15 no. 2 (2013) h.106–114
- Oh, B.C, Choi W.C, Park S, Kim Y.O, Oh T.K. *Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytase*. *Appl Microbiol Biotechnol* 63: 362-372, 2004.
- Panday, ashok. Szakacs, George. Soccol, Carlos R. “Production, Purification, and Properties of Microbial Phytases” *Bioresource Technology* 77 (2001): h.203-214
- Poedjiadi, Prof. D. Anna dan Titin Supriyanti. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta: UI-Press, 2006.
- Risnawati. “Optimalisasi substrat dan waktu inkubasi bakteri simbion makroalga *euchema* sp Penghasil enzim L-asparaginase”. *skripsi* Makassar: Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin, 2015.
- Rombola TH, Pedrinho EAN, Lemos EGM, Goncalves AM, Santos LFJ, Jr JMP. Identification and enzymatic characterization of acid phosphatase from *Burkholderia gladioli*. *BMC Research Notes*. 7 (2014): 221
- Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan DJ, Dowling DN. Bacteria endophytes: recent developments and applications. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology*. 278 (2007): 1-9.
- Sahar, Windy. “Pemurnin enzim L-Asparaginase dari bakteri simbion makroalga *Euchema* sp dengan kromatografi filtrasi gel sephadeks G-75 dan ion exchange CMC-50”. *Skripsi*. Makassar: Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam negeri Alauddin Makassar, 2015.
- Sangadji, Insun. *Enzim Fitase dan Peranannya dalam Memecah Ikatan Asam Fitat pada Pakan*. Makalah Pengantar Falsafah Sains, Program Pasca Sarjana ITB, 2004. (Diakses 06 Mei 2016)
- Santoso, Slamet dan Sajidan. “Keberadaan Bakteri Penghasil Fitase untuk Perbaikan Kesuburan Tanah Vertisol pada berbagai Sistem Budidaya Tanam di

- Kecamatan Gondangrejo Kabupaten Karanganyar” *Bioedukasi*. 6 no.1 (Februari 2013): h. 1-11.
- Sasirekha B., Bedashree and Champa. “Optimization and partial purification of extracellular phytase from *Pseudomonas aeruginosa* p6 2 no.(1) (2012): h.95-104.
- Scopes, R.K., 1982, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springerverlag, New York, Berlin
- Shihab, M. Qurais. *Tafsir Al-Misbah; Pesan, Kesan, dan Keserasian Al-Qur’an*, Jakarta: Lentera Hati, 2002.
- Shimizu, Mikio. “Purification and Characterization of Phytase from *Bacillus subtilis* (Natto) N-77 56 no.(8) (February 1992): h. 1266-1269.
- Shinya H. *The Miracle of Enzyme*. Bandung: Mizan Utama, 2008.
- Singh., Dharmendra., Gupta” Isolation of Phytase Producing Bacteria and Optimization of Phytase Production Parameters” *Jundishapur Journal of Microbiology*. (July 2013) 6 no.5 p. 1-6.
- Springer Science, 2007.
- Suarni dan S. Widowati. *Struktur, Komposisi, dan Nutrisi Jagung*. Maros: Balai Penelitian Tanaman Serealia, 2001. (Diakses 06 Mei 2016)
- Suhartono, M. T., Suwanto, A., dan Widjaja H. *Diktat Struktur dan Biokimiawi Protein*, PAU IPB, Bogor, 1992.
- Suhartono, M.T. 1989. *Enzim dan bioteknologi*. Direktorat jendral pendidikan tinggi antar universitas bioteknologi, instirut pertanian Bogor, 172-220.
- Sumardjo D. *Pengantar Kimia. Buku panduan kuliah mahasiswa kedokteran*. Jakarta: Penerbit Erlangga, 2006.
- Susana., Tangenia., Hastiono “seleksi kapang penghasil enzim fitase “ *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*. 5 no.1 (2000) h.1-6
- Thayyarah, Nadiah. *Buku Pintar Sains dalam al-qur’an.*, Jakarta: Zaman, 2014.
- Thyagarajan, r. Namasivayam, KR And Narendrakumar, G. “Partial Purification Of Phytase From *Hypocrea Lixii* Surt01, A Poultry Isolate” *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 5 no. 4 (Oktober 2014): h. 1-8.

- Tran, T.T. "Thermostable phytase from a *Bacillus* sp. Heterologous production, mutation, characterization and assay development". *Doctoral Thesis*. USA: Department of Biotechnology Lund University, 2010.
- Tungala, Avinash., K.Anantha and Meekashi Muthurahman "Isolation of phytase produce bacteria from poultry faeces and optimization of culture condition for enhanced phytase production". *Internation Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*. 5 no. 4 (2013) p. 264-269.
- Unno, Y., Okubo, K., Wasaki, J., Shinano, T., and Osaki, M. Plant growth promotion abilities and microscale bacterial dynam-ics in the rhizosphere of Lupin analysed by phytate utilization abil-ity. *Environ. Microbiol.*, 7, No. 396 (2005): 40.
- Vanlaere , Elke, Adam Baldwin, Dirk Gevers, Deborah Henry, Evie De Brandt, John J. LiPuma, Eshwar Mahenthiralingam, David P. Speert, Chris Dowson and Peter Vandamme. Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* No. 59 (2009): 102–111.
- Wulandari, Rita. Analisis Gen 16S rRNA Pada Bakteri Penghasil Enzim Fitase. Tidak diterbitkan: *Tesis*. Surakarta: Universitas Sebelas Maret, 2015
- Yazida, E dan Nursanti L. *Penuntun Praktikum Biokimia Untuk Mahasiswa Analisis*, Gresik: Andi offset, 2006.
- Yazida, Estien dan Nursanti Lisda. *Penuntun Praktikum Biokimia Untuk Mahasiswa Analisis*, Gresik: Andi offset, 2006.
- Yuanita, Leny 2010. *Isolasi, Pemurnian dan Karakterisasi Fitase Bacillus subtilis Dari Holiwood Gresik*.
- Zulmanwardi dan Pirman. *Bahan ajar teknologi bioproses dan bioteknologi*. Makassar: PNUP press, 2012.

Lampiran: Skema kerja



Lampiran: Perhitungan Pembuatan Buffer Tris-HCl 0,1 M pH 7

Diketahui Mr Tris = 121,14 gr/mol

M = 0,1 M

V = 500 mL

Ditanyakan: Massa = gram?

Penyelesaian:

$$\text{Molaritas} = \frac{M}{M} \times \frac{1}{V}$$

$$\text{Massa} = \frac{M \cdot M \cdot V}{1} = \frac{0,1 \cdot 121,14 \cdot 0,5}{1} = \frac{6}{1} = 6,057 \text{ gram}$$

Jadi, 6,057 gram timbang Tris dilarutkan ke 400 mL aquadest steril, kemudian diukur pH. Untuk mendapat pH 7, maka pH diatur dengan ditambahkan HCl 6 M sebagai asam dan NaOH sebagai basa, volume Buffer mencapai 500 mL.

Atau dengan cara

Untuk pembuatan 0,1 M Tris-Hcl pH 7 500 mL

$$\begin{aligned} \text{gr} &= \text{Mr} \cdot M \cdot V(\text{L}) \\ &= 121,14 \text{ gr/mol} \cdot 0,1 \text{ M} \cdot 0,5 \text{ L} \\ &= 6,057 \text{ gr.} \end{aligned}$$

Lampiran: Perhitungan Pembuatan Substrat pada pengukuran Aktivitas Fitase
100 mL Buffer Tris-HCl 0,1 M pH 7 mengandung 2 mM Ca-Fitat dan 2 mM
CaCl₂.

Diketahui: V Tris-HCl 0,1 M pH7 = 100 mL (0,1 L)

M Ca-Fitat = 2 mM (0,002 M)

M CaCl₂ = 2 mM (0,002 M)

Ditanyakan: a. Massa(gr) Ca-Fitat =?

b. Massa (gr) CaCl₂ =?

Penyelesaian:

a. Mr Ca-Fitat (Ca₆C₆H₆O₂₄P₆)

$$\text{Mr} = (\text{Ar Ca} \times 6) + (\text{Ar C} \times 6) + (\text{Ar H} \times 6) + (\text{Ar O} \times 24) + (\text{Ar P} \times 6)$$

$$\text{Mr} = (40,08 \times 6) + (12,01 \times 6) + (1,01 \times 6) + (16,00 \times 24) + (30,97 \times 6)$$

$$\text{Mr} = 240,48 + 72,06 + 6,06 + 384 + 185,82 = 888,42 \text{ gr/mol}$$

$$\text{gr} = \text{Mr} \times \text{M} \times \text{V}$$

$$= 888,42 \text{ gr/mol} \times 0,002 \times 0,1 \text{ L}$$

$$= 0,1778 \text{ gr.}$$

b. Mr CaCl₂

$$\text{Mr} = (\text{Ar Ca} \times 1) + (\text{Ar Cl} \times 2)$$

$$\text{Mr} = (40,08 \times 1) + (35,453 \times 2)$$

$$\text{Mr} = 40,08 + 70,906 = 110,986 \text{ gr/mol}$$

$$\text{gr} = \text{Mr} \times \text{M} \times \text{V}$$

$$= 110,98 \text{ gr/mol} \times 0,002 \times 0,1 \text{ L}$$

$$= 0,22 \text{ gr.}$$

Jadi, ditimbang 0,178 gram Ca-Fitat dan 0,022 gram CaCl_2 , kemudian dilarutkan dalam gelas beker 100 mL Tris-HCl 0,1 M pH 7



Lampiran: Perhitungan Pembuatan buffer Tris-HCl+NaCl+ CaCl₂

0,2 M NaCl dalam Buffer Tris-HCl 0,1 M 50 mL (0,005 L)

NaCl 0,2 M

Ar Na= 23 ; Ar Cl= 35,5

Mr NaCl= 23+ 35,5= 58,5 gr/mol

gr = M x Mr x V (L)

$$=0,2 \times 58,5 \times 0,005$$

$$= 0,585$$

0,01 M CaCl₂ dalam Buffer Tris-HCl 0,1 M 50 mL (0,005 L)

CaCl₂ 0,01 M

Ar Ca= 40 ; Ar Cl₂= 35,5

Mr CaCl₂= 40 + (2 x 35,5)= 111 gr/mol

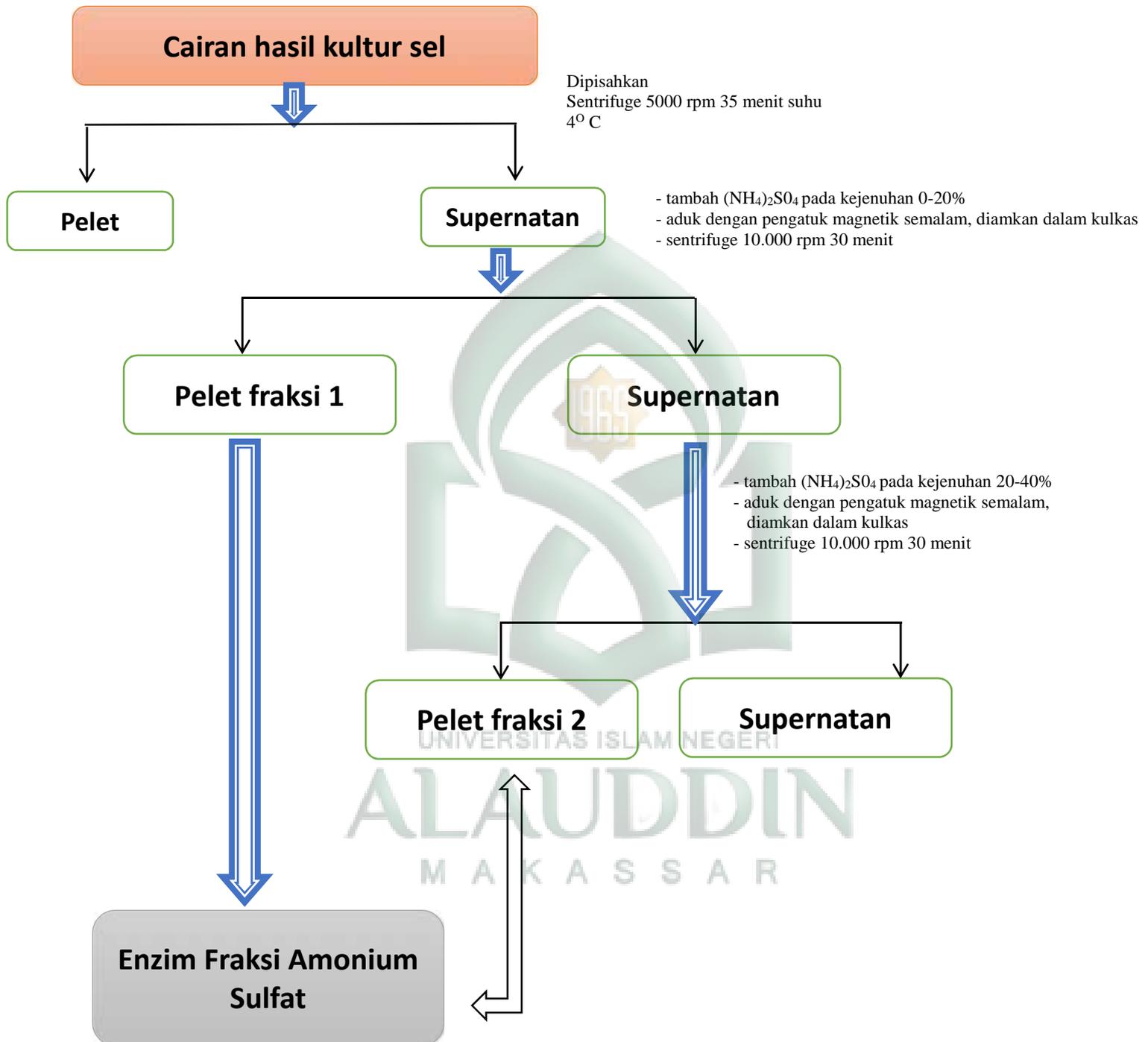
gr = M x Mr x V (L)

$$=0,01 \times 111 \times 0,005$$

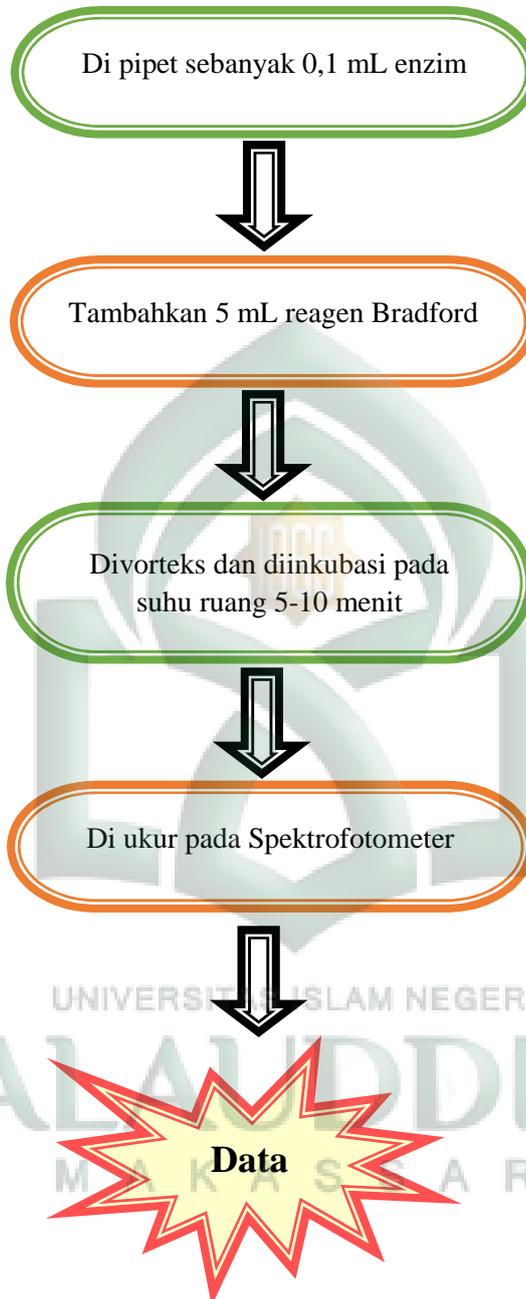
$$= 0,00555$$



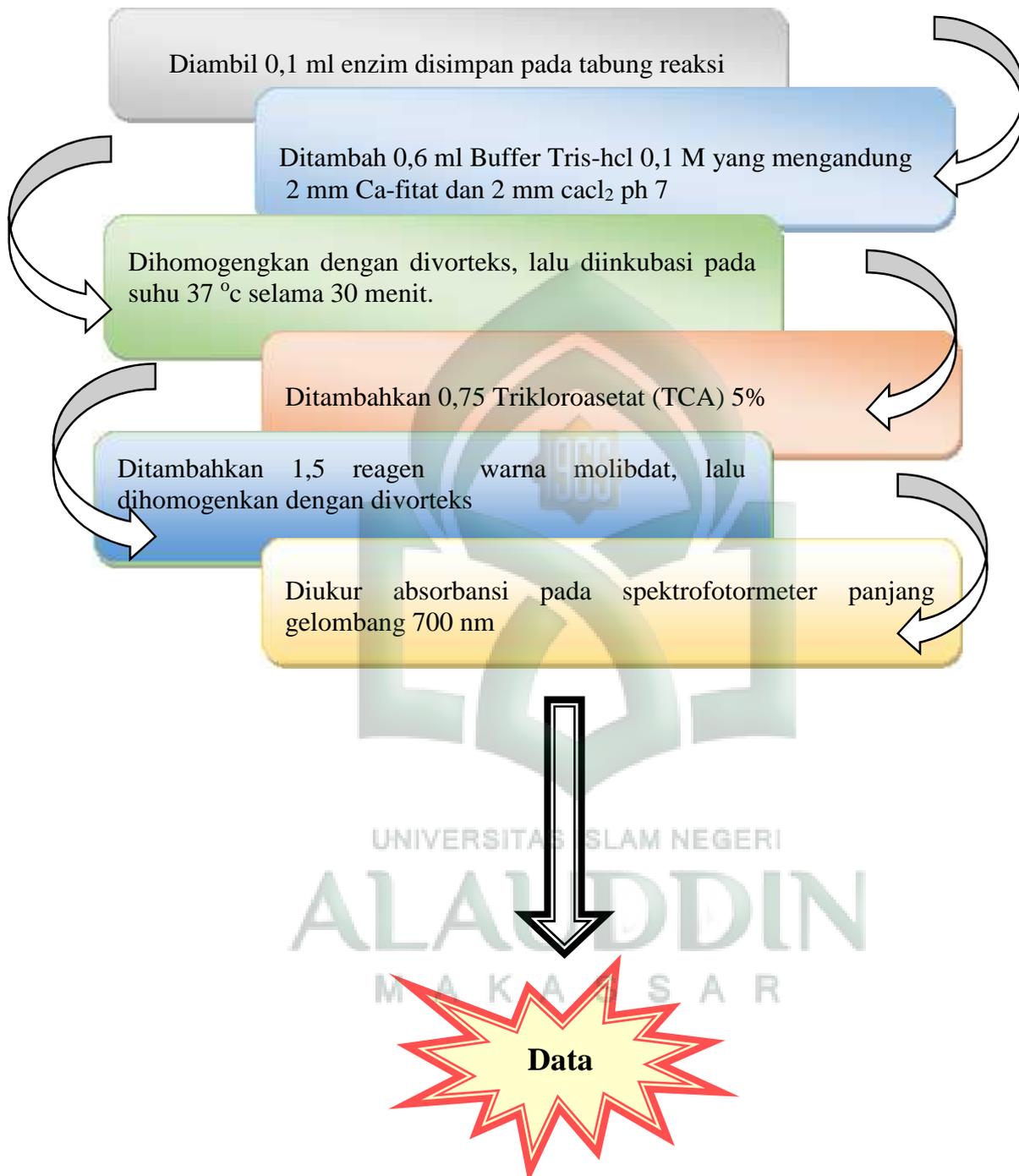
Lampiran: Fraksinasi Ammonium Sulfat



Lampiran: Penentuan Kadar Protein metode Bradford

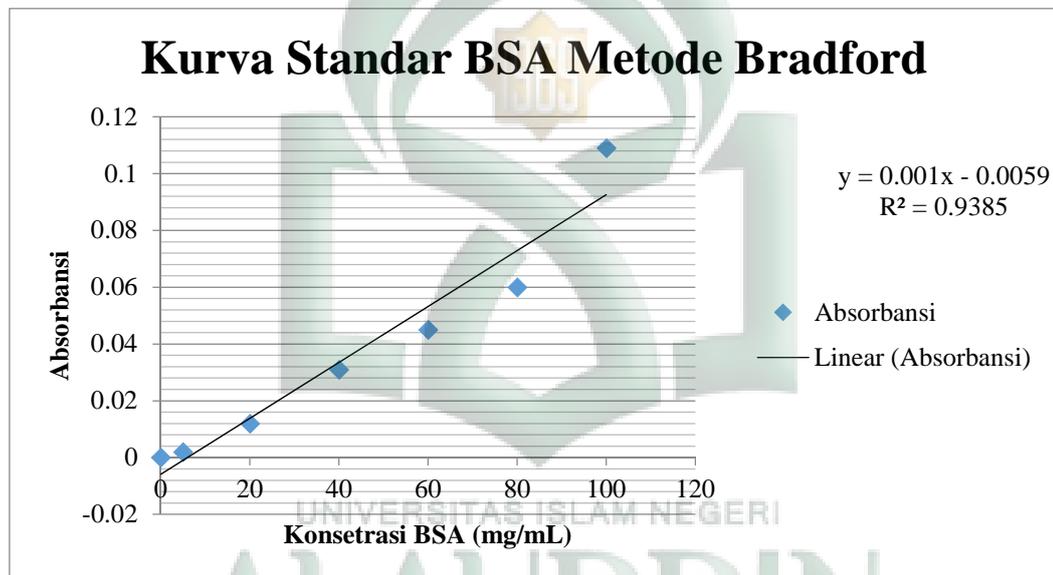


Lampiran: Penentuan aktivitas Fitase



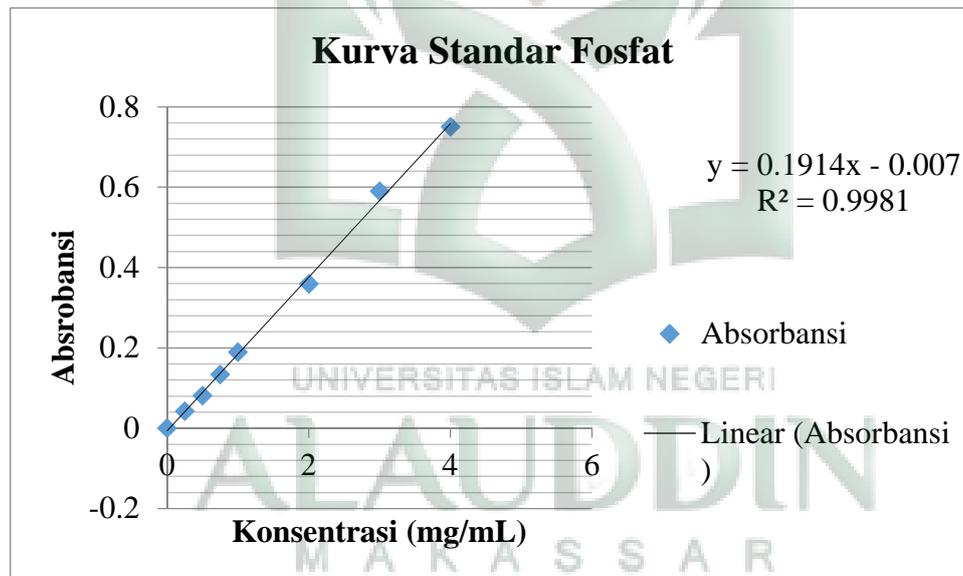
Lampiran: Kurva standar Pengukuran kadar protein dengan metode Bradford

Konsentrasi BSA ppm	Absorbansi
0	0
5	0.002
20	0.012
40	0.031
60	0.045
80	0.06
100	0.109



Lampiran: Kurva standar Pengukuran aktivitas enzim menggunakan pereaksi molibdat

Konsentrasi Fosfat	Absorbansi
0	0
0.25	0.042
0.5	0.081
0.75	0.134
1	0.189
2	0.359
3	0.59
4	0.75



Tabel penambahan Amonium Sulfat pada 1 L larutan (Sumber Robert Scopes 1987).

Kejenuhan	Untuk 1 L	Untuk 2 L
0-20%	113 gr	226 gr
20-40%	121 gr	242 gr
40-60%	130 gr	260 gr
60-80%	140 gr	280 gr
80-100%	152 gr	304 gr

Ekstrak kasar enzim 900 mL jadi, penambahan amonium sulfat pda kejenuhan 0-20% = ...

$$\frac{1}{1} \times 900 = 101,7 \text{ gr}$$



Perhitungan kadar protein

Perhitungan kadar protein enzim fitase ditentukan dengan cara mensubstitusi absorbansi larutan contoh ke dalam persamaan regresi dari kurva larutan standar. Kurva yang digunakan didasarkan pada data dari larutan standar albumin (BSA). Absorbansi diukur pada panjang gelombang 595 nm.

Penentuan aktivitas spesifik Fitase

Aktivitas spesifik enzim Fitase dinyatakan sebagai jumlah satuan (Unit) enzim Fitase per miligram protein enzim Fitase.

$$\text{Aktivitas spesifik (U/mg)} = \frac{A_{595} \times F}{K \times p \times e \times F} \frac{(U/m)}{(m/m)}$$

LAMPIRAN: abs kadar protein setelah kromatografi filtrasi gel sephadexs G-100

FRAKSI	ABS (ABSORBANSI)
F1	0,000
F2	0,000
F3	0,015
F4	0,014
F5	0,028
F6	0,032
F7	0,020
F8	0,017
F9	0,021
F10	0,024
F11	0,031
F12	0,023
F13	0,022
F14	0,012
F15	0,008
F16	0,005
F17	0,000
F18	0,000
F19	0,000
F20	0,000

Untuk mengetahui kadar protein F3

$$y = 0,001x - 0,0059$$

$$0,015 = 0,001x - 0,0059$$

$$0,015 + 0,0059 = 0,001x$$

$$0,0209 = 0,001x$$

$$x = \frac{0,0209}{0,001} = 20,9$$

LAMPIRAN: abs aktivitas enzim setelah kromatografi filtrasi gel sephadeks G-100

FRAKSI	ABS (ABSORBANSI)
F1	0,000
F2	0,000
F3	1,202
F4	1,238
F5	1,207
F6	1,173
F7	1,216
F8	1,225
F9	1,298
F10	1,290
F11	1,285
F12	1,265
F13	1,257
F14	1,283
F15	1,272
F16	1,296
F17	0,000
F18	0,000
F19	0,000
F20	0,000

Untuk mencari aktivitas enzim F3

$$y = 0,1914x - 0,007$$

$$1,202 = 0,1914x - 0,007$$

$$1,202 + 0,007 = 0,1914x$$

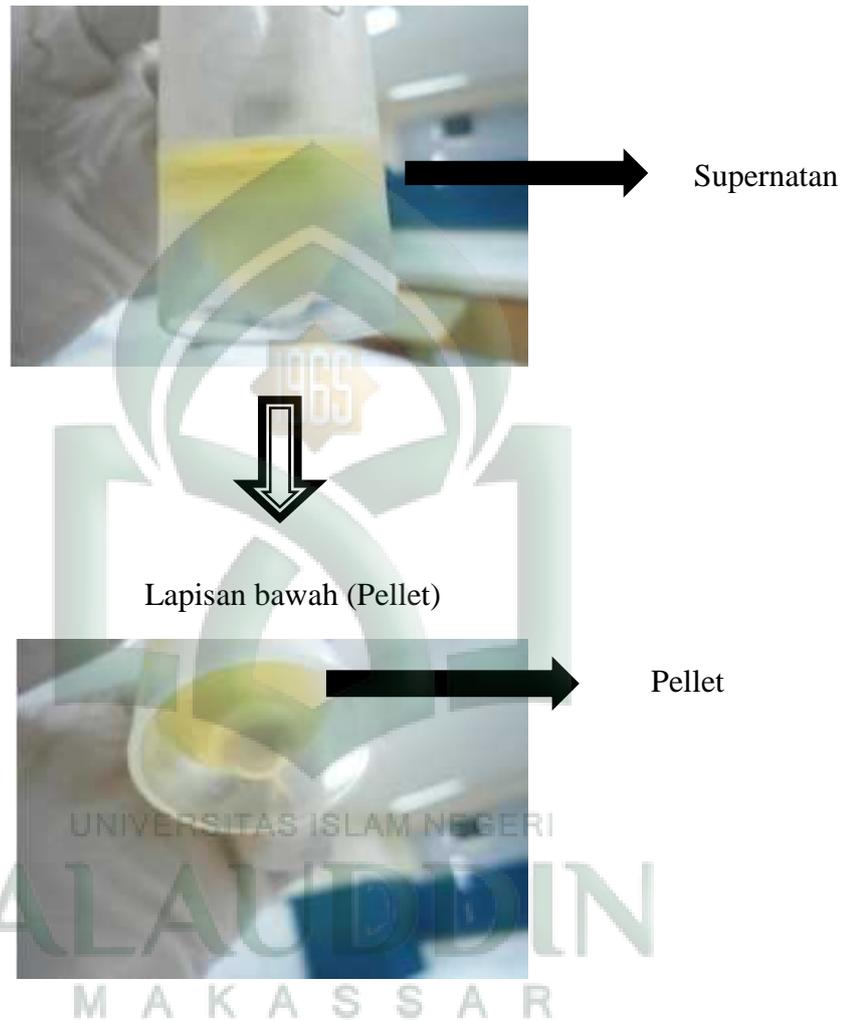
$$1,209 = 0,1914x$$

$$x = \frac{1,2}{0,1} = 6,32$$

Lampiran : Dokumentasi Penelitian

1. Isolasi ekstrak kasar enzim (*crude enzym*)

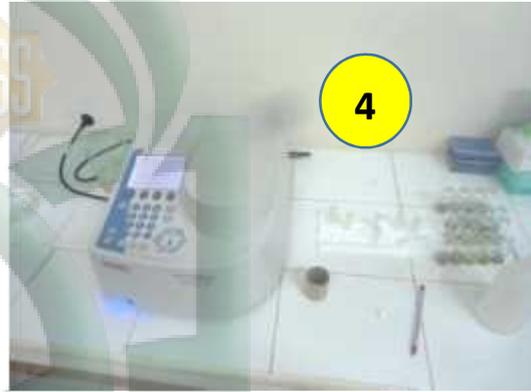
Setelah sentrifugasi Lapisan atas (Supernatan)



2. Pembuatan Reagen Bradford

	
<p>Ditimbang CBB G-250</p>	<p>Dilarutkan dalam etanol dan asam fosfor</p>
	
<p>Disaring hingga berwarna coklat jernih</p>	<p>Disimpan pada wadah yang gelap</p>

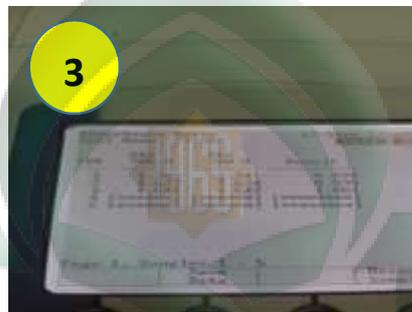
3. Preparasi pengukuran kadar protein



Keterangan:

1. menyiapkan enzim yang akan dianalisis dan reagen bradfor
2. dipipet masing-masing enzim 0,1 mL
3. ditambahkan reagen bradfor 5 mL,
4. diinkubasi kemudian ukur absorbansi menggunakan spektrofotometer.

4. Preparasi Pengukuran aktivitas enzim



Keterangan:

1. Dipipet masing-masing enzim yang akan dianalisis sebanyak 0,15 mL kemudian ditambahkan 0,6 mL substrak buffer tris-HCl 0,1 M yang mengandung 2mM Ca-Fitat dan 2mM CaCl₂ , ditambahkan 0,75 MI TCA 5% dan 1,5 mL reagen molibdat
2. Vortex lalu di inkubasi
3. Diukur absorbansi pada spektrofotometer.
5. **Fraksinasi Amonium Sulfat pada Kejenuhan 0-20% sampai 80-100%**



1. Menyiapkan supernatan enzim (*Crude enzyme*)



2. Menjaga agar suhu enzim tetap dingin (4° C)



3. ditambahkan sedikit demi sedikit amonium sulfat pada kejenuhan 0-20% dan dihomogenkan hingga larut



4. ekstrak kasar enzim yang telah difraksinasi



5. enzim dimasukkan ke dalam botol dan diendapkan semalaman di dalam freezer



6.



6. setelah *crude* enzim diendapkan semalaman disentrifuge pada kecepatan 10.000 rpm di Laboratorium Bioteknologi terpadu fakultas ilmu peternakan UNHAS

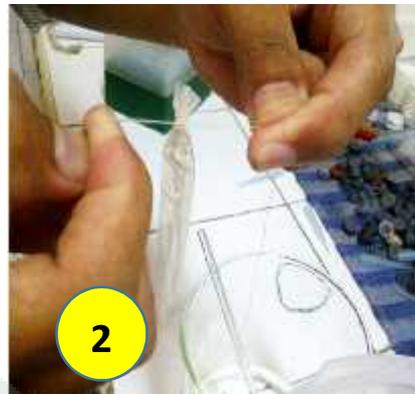
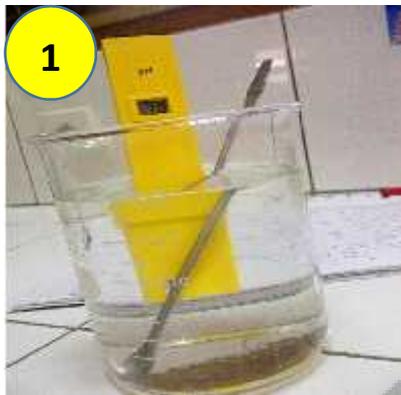


7. endapan hasil fraksinasi pada kejenuhan 0-20% amonium sulfat.



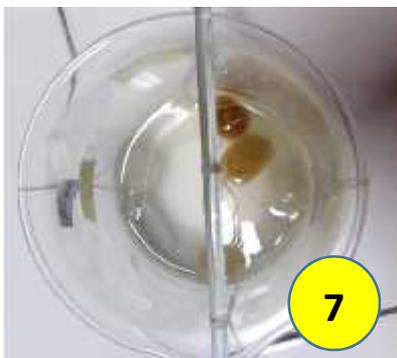
8. Hasil Fraksinasi amonium sulfat pada kejenuhan 0-20% sampai 80-100%

Preparasi untuk dialisis



UNIVERSITAS ISLAM NEGERI





Keterangan:

1. Membuat buffer Tris-HCl pH 7
2. Menggantung membrane selofan dan mengikat pada salah satu ujungnya
3. Menyiapkan enzim hasil fraksinasi
4. Memasukkan ke lima fraksi enzim ke dalam membrane selofan yang telah di preparasi tadi kemudian menggantungkan di dalam gelas *beaker* (tampak pada gambar) menggunakan benang
5. Memasukkan buffer Tris-HCl yang tadi dibuat hingga semua buffer tenggelam
6. Menghomogenkan menggunakan strirrer, dan diamati agar masing-masing fraksi tidak ada yang saling melilit serta menjaga suhunya agar tetap dingin (4°C).
7. Mengganti buffer hingga beberapa kali

Preparasi untuk Kromatografi filtrasi gel

Preparasi matriks (sephadexs G-100)

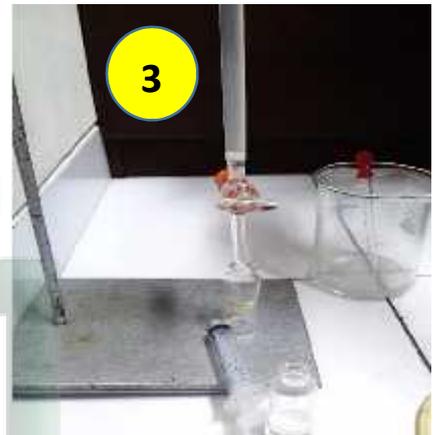


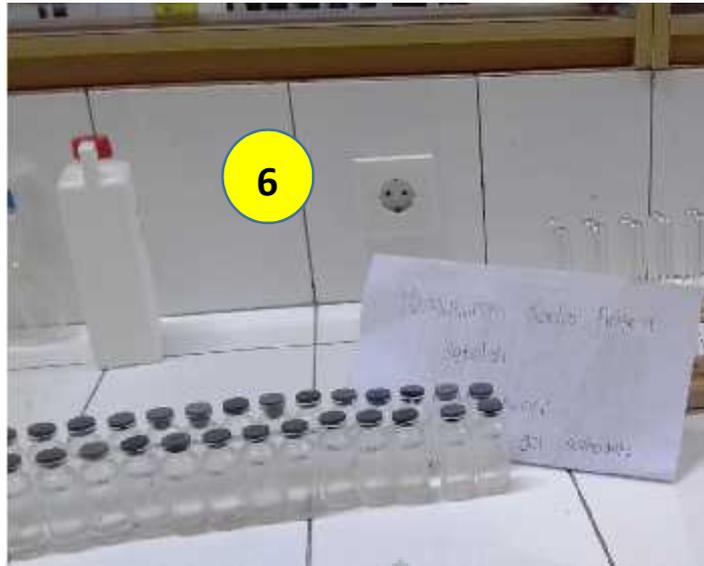
Keterangan:

1. Menimbang bubuk gel sephadexs G-100
2. Disimpan ke dalam gelas *beaker*
3. Dilarutkan dengan aquadest hingga melewati bata bubuk

4. Distirrer selama 2 jam
5. Didekantasi beberapa menit sampai terbentuk 2 fase (aquadest dan gel) dan mengeluarkan aquadest dengan cara dipipet hingga hanya fase gel yang tersisa.
6. Ditambahkan buffer tris-HCl pH 7
7. Di stirrer selama 1 jam
8. Di kembangkan semalam pada suhu 4° C

Proses *Packing* gel



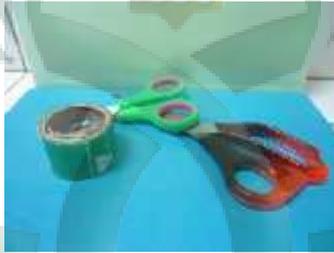
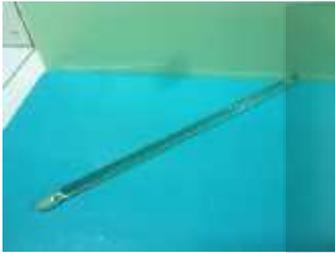


Keterangan:

1. Matriks sephadex yang telah dikembangkan semalaman dimasukkan ke dalam kolom kromatografi sedikit demi sedikit dan dijaga agar tidak ada gelembung yang terbentuk
2. Menyiapkan sampel fraksi enzim terbaik hasil dialisis (fraksi 60-80%)
3. Memasukkan sampel kedalam kolom secara perlahan
4. Setelah semua fraksi masuk kedalam matriks, ditambahkan buffer Tris-HCl 0,1 M pH 7, kemudian buffer Tris-HCl + NaCl, kemudian buffer Tris-HCl + NaCl+ CaCl₂
5. Memutar kran kolom kromatografi dan menampung *pure* enzim yang keluar dan ditentukan dengan volume masing-masing 3 mL hingga mencapai 45 Fraksi (botol).
6. Hasil 45 fraksi *pure enzyme* setelah melalui proses kromatografi filtrasi gel.

Lampiran: Dokumentasi Alat dan Bahan





UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
LAUDDIN
M A K A S S A R





UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
ALAUDDIN
M A K A S S A R

RIWAYAT HIDUP



Husnul Hatimah lahir di Pangkajene dan Kepulauan, Sulawesi Selatan pada tanggal 18 Januari 1996 yang merupakan buah hati pertama dari 4 bersaudara dari pasangan Muh. Saleh. L dan St. Arfah. A ☺. Pada tahun 2001-2006 penulis menempuh sekolah dasar di SDN 2 Lejang, Kab. Pangkep. Selanjutnya penulis melanjutkan sekolah di SMP Negeri 1 Bungoro dan setelah lulus melanjutkan sekolah menengah atas di SMA Negeri 2 Unggulan Kab. Pangkajene (SMADA PANGKEP) angkata ke-2 (The sertion alias *second generation of Smada*) dan lulus di tahun 2013.

Lulus dari SMA penulis melanjutkan pendidikan S1 di Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar, Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi. Selama menjadi mahasiswa penulis aktif menjadi pengurus HMJ Biologi Sains periode 2014-2015. Penulis juga pernah membuat suatu karya autobiografi yang berjudul "*Bitter-sweet experience og my life*" dan sebuah novel yang berjudul "*Dream, Love and Destiny*". Karya tersebut merupakan proyek tahunan SMADA Pangkep. Penulis juga aktif sebagai asisten praktikum dan menjalani PKL di Laboratorium Nechri Rumah Sakit Wahidin Sudirohusodo dan Laboratorium Molekuler Rumah Sakit Pendidikan Unhas.