

SELEKSI KAPANG PENGHASIL ENZIM FITASE

I.W.R. SUSANA¹, B. TANGENJAYA¹, dan S. HASTIONO²

¹Balai Penelitian Ternak, Ciawi, P.O. Box 221, Bogor 16602, Indonesia

²Balai Penelitian Veteriner, Jalan RE Martadinata 30, P.O. Box 151, Bogor 16114, Indonesia

(Diterima dewan redaksi 23 Desember 1999)

ABSTACT

SUSANA, I.W.R., B. TANGENJAYA, and S. HASTIONO. 2000. Selection of phytase-producing moulds. *J. Ilmu Ternak Vet.* 5 (2): ...

Organic phosphorous in the form of phytate salts are found in feed component originated from cereals which can not be digested by chicken unless after the addition of an enzyme, i.e. phytase. A research to investigate phytase-producing moulds had been carried out. A total of 60 isolates from various collection units and isolation from samples had been collected then screened in Czapek's medium with Ca-phytate as the source of phosphorous. From mould growth measurements and clearing zones formation there were 4 mould isolates, i.e. *Aspergillus ficuum* NRRL 3135 and NRRL 320, *Aspergillus niger* M94/18/D2 (Balitvet isolate), and *Aspergillus niger* no. 58 (IPB isolate), which were further observed. Enzyme was produced from medium containing 8% of corn's starch, 3% of glucose, 0.0005% of KCl and MgSO₄.7H₂O, 0.0002% of K₂HPO₄, and 0.00018% of FeSO₄.7H₂O. The enzyme activity, protein and biomass contents were observed at 16, 24, 32, 48 and 72 hours incubations for *Aspergillus niger* and at 1, 2, 3, 4 and 5 days incubations for *Aspergillus ficuum*. The highest protein content was found at 5 days incubation for *Aspergillus ficuum* NRRL 3135 and NRRL 320, (165 and 169 µg/ml respectively), while for *Aspergillus niger* (Balitvet and IPB isolates) at 16 hours incubation (102 and 112 µg/ml respectively). Meanwhile, the biomass contents were decreased in accordance with the duration of incubations. The maximum enzyme productions were reached at 24 hours incubation for *Aspergillus niger* and at 4 days incubation for *Aspergillus ficuum*. The highest phytase activities were reached at 2.808 U/ml for *Aspergillus ficuum* NRRL 3135, followed by 1.520 U/ml for *Aspergillus ficuum* NRRL 320. *Aspergillus niger* produced enzyme quicker than the other moulds, with lower activity level and decreases quicker at the following hours.

Key words: Phytate, phytase, *Aspergillus ficuum*, *Aspergillus niger*

ABSTRAK

SUSANA, I.W.R., B. TANGENJAYA, dan S. HASTIONO. 2000. Seleksi kapang penghasil enzim fitase. *J. Ilmu Ternak Vet.* 5 (2): ...

Fosfor organik dalam bentuk garam fitat banyak terdapat di dalam bahan pakan yang berasal dari biji-bijian dan tidak dapat dicerna oleh unggas kecuali bila ditambah suatu enzim, yaitu fitase. Suatu penelitian untuk memperoleh kapang penghasil fitase telah dilakukan. Sebanyak 60 isolat dari berbagai instansi dan pengisolasian dari contoh telah dikumpulkan, kemudian diseleksi pada medium Czapek dengan kalsium fitat sebagai sumber fosfor. Dari pengukuran pertumbuhan kapang dan pembentukan daerah jernih diperoleh 4 isolat kapang, yakni *Aspergillus ficuum* isolat NRRL 3135 dan NRRL 320, *Aspergillus niger* M94/18/D2 (isolat Balitvet) dan *Aspergillus niger* no. 58 (isolat IPB), yang akan diamati lebih lanjut. Produksi enzim dilakukan dalam medium yang mengandung pati jagung 8%, glukosa 3%, KCl dan MgSO₄.7H₂O 0,0005%, K₂HPO₄ 0,0002% dan FeSO₄.7H₂O 0,00018%. Aktivitas enzim, kandungan protein dan biomassa diamati pada inkubasi selama 16, 24, 32, 48 dan 72 jam untuk *Aspergillus niger* dan pada inkubasi selama 1, 2, 3, 4 dan 5 hari untuk *Aspergillus ficuum*. Kandungan protein paling tinggi diperoleh pada 5 hari inkubasi untuk *Aspergillus ficuum* NRRL 3135 dan NRRL 320 (masing-masing 165 dan 169 µg/ml), sedangkan untuk *Aspergillus niger* isolat Balitvet dan isolat IPB pada 16 jam inkubasi (masing-masing 102 dan 112 µg/ml). Kandungan biomassa semakin menurun sebanding dengan lamanya inkubasi. Produksi enzim maksimum untuk *Aspergillus niger* dicapai pada inkubasi 24 jam dan *Aspergillus ficuum* pada inkubasi 4 hari. Aktivitas fitase paling tinggi dicapai oleh *Aspergillus ficuum* NRRL 3135 sebesar 2,808 U/ml, diikuti kemudian oleh *Aspergillus ficuum* NRRL 320 sebesar 1,520 U/ml. *Aspergillus niger* ternyata lebih cepat memproduksi enzim dibandingkan dengan kapang lain, dengan aktivitas lebih rendah dan lebih cepat menurun pada jam berikutnya.

Kata kunci : Fitat, fitase, *Aspergillus ficuum*, *Aspergillus niger*

PENDAHULUAN

Asam fitat (asam mio-inositol heksa fosfat) dan turunannya adalah senyawa fosfor organik yang banyak terdapat di dalam biji-bijian dan sereal. Telah

dilaporkan bahwa lebih dari 80% fosfor total dalam tanaman merupakan senyawa fitat (LOLAS dan MARKAKIS, 1977). Senyawa fitat tidak dapat dipakai sebagai sumber fosfor oleh ternak monogastrik, karena tidak adanya enzim fitase yang dapat memecah fosfor

dari senyawa fitat di dalam usus halus pada sistem pencernaannya (NELSON, 1967). Asam fitat bersifat sebagai agen khelat, sehingga dapat berikatan dengan mineral-mineral berbagai valensi (Ca^{2+} , Fe^{3+} dan Zn^{2+}) membentuk senyawa kompleks (khelat) yang tidak larut dan menyebabkan gangguan pada penyerapan mineral tersebut di atas, sehingga dapat menyebabkan ternak menderita defisiensi mineral (MAGA, 1982). Selain itu, senyawa fitat juga menurunkan pencernaan protein (KNUCKLES *et al.*, 1989), pati (YOON *et al.*, 1983) dan juga lipida (NYMAN dan BJORCK, 1989).

Fitase adalah enzim yang dapat memecah senyawa fitat menjadi mio-inositol dan fosfor anorganik (asam fosfat). Fitase terdapat di dalam biji-bijian (E.C.3.1.3.26) dan menyerang gugus fosfat pada posisi nomor 6 dari asam fitat. Fitase dari mikroba (E.C.3.1.3.8) menyerang gugus fosfat pada posisi ke-3 (ZYLA, 1992). SHIEH dan WARE (1968) telah mempelajari berbagai mikroorganisme baik kapang maupun bakteri yang dapat memproduksi enzim fitase dan melaporkan bahwa *Aspergillus ficuum* NRRL 3135 dapat menghasilkan enzim dengan aktivitas paling tinggi.

Penelitian ini bertujuan mendapatkan informasi tentang kapang penghasil fitase yang dapat digunakan untuk memproduksi enzim fitase yang akan diberikan ke dalam makanan ternak. Dari hasil skrining, kapang terpilih diamati produksi enzimnya.

MATERI DAN METODE

Sumber kapang

Kapang yang akan diseleksi terdiri atas kapang dari kelompok *Aspergillus niger* isolat murni yang dikumpulkan dari berbagai instansi, yaitu beberapa laboratorium mikrobiologi/mikologi dari Balai Penelitian Tanaman Pangan Bogor, Pusat Penelitian dan Pengembangan Biologi LIPI Bogor, Balai Penelitian Veteriner Bogor, Teknologi Pangan dan Gizi Fakultas Teknologi Pertanian IPB Bogor, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam IPB Bogor dan Balai Penelitian Ternak Ciawi, Bogor. Jumlah isolat yang terkumpul dari berbagai instansi dapat dilihat pada Tabel 1.

Selain itu, dilakukan juga pengisolasian kapang dari contoh tanah gunung kapur dan kebun jagung, bahan baku padat yang tercecer di gudang pabrik minyak goreng, sisa pakan dari kandang domba, sisa dedak dari kandang kambing, contoh dedak dari Kali Abang, Bekasi, roti yang kedaluwarsa dan tanah kebun bawang putih (Tabel 2).

Tabel 1. Isolat murni kelompok *Aspergillus niger* dari berbagai instansi

Instansi	Jumlah
Balai Penelitian Tanaman Pangan, Bogor	5
Puslitbang Biologi/Kebun Raya-LIPI, Bogor	14
Balai Penelitian Veteriner, Bogor	10
Teknologi Pangan dan Gizi Fateta-IPB, Bogor	3
Jurusan Biologi FMIPA-IPB, Bogor	9
Balai Penelitian Ternak, Ciawi, Bogor	1

Tabel 2. Sumber dan jenis contoh untuk isolasi kapang penghasil fitase

Sumber dan jenis contoh	Jumlah
Tanah gunung kapur, Ciampea	5
Tanah kebun jagung, Ciampea	4
Tanah kebun jagung, Ciawi	2
Sisa bahan baku gudang PT Bimoli, Tanjung Priok	1
Sisa pakan dari kandang domba, PT Hirema	1
Sisa dedak dari kandang kambing, Bekasi	1
Roti kadaluwarsa, Ciawi	1
Tanah kebun bawang putih, Ciawi	1

Isolasi kapang

Isolasi kapang dari contoh dilakukan pada medium *Sabouraud's dextrose agar* (SDA) yang mengandung 0,2% khloramfenikol. Berbagai macam contoh yang diisolasi kapangnya sebagai penghasil fitase dapat dilihat pada Tabel 2. Sebanyak 1 g contoh diencerkan berkecilipatan 10 dengan air suling steril sampai menjadi enceran 10^{-3} - 10^{-5} . Suspensi dipipetkan 1 ml ke dalam cawan-cawan Petri kosong steril, kemudian dituangi medium SDA yang telah mencair ± 15 ml. Cawan Petri ditutup, digoyang-goyang secara berputar sampai suspensi tercampur homogen dengan medium, lalu dibiarkan sampai medium menjadi padat, kemudian diinkubasikan pada suhu kamar ($\pm 25^{\circ}$ C) selama beberapa hari (THOMPSON, 1969).

Pertumbuhan kapang diamati setiap hari dan kapang yang diduga sebagai kelompok *Aspergillus niger* diisolasi, diidentifikasi secara makroskopik dan mikroskopik, lalu dimurnikan (RAPER dan FENNELL, 1973).

Skrining kapang penghasil fitase

Skrining kapang penghasil fitase dilakukan dengan menggunakan medium Czapek dengan kalium fitat 0,5% sebagai sumber fosfat (SHIEH dan WARE, 1968). Komposisi medium Czapek terdiri atas: 20 g agar Bacto, 30 g glukosa, 0,18 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g KCl, 5 g kalsium fitat, 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g NaNO_3 , dan 1.000 ml air suling. Semua bahan dilarutkan dalam air suling sampai volumenya 1 liter dan pH diatur sampai 5. Larutan medium kemudian disterilisasi dalam otoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, lalu dituangkan secara aseptis ke dalam cawan-cawan Petri masing-masing 15-20 ml. Cawan Petri kemudian dibiarkan sampai medium menjadi padat.

Setelah medium menjadi dingin dan padat, setiap cawan diinokulasi dengan 3 jenis kapang yang salah satunya adalah *Aspergillus ficuum* sebagai standar. Ulangan dilakukan sebanyak 3 kali dan semua cawan diinkubasi pada suhu 25°C selama 3 hari. Pada hari ke-2 dan ke-3 diameter pertumbuhan kapang dan diameter zona jernih diukur. Dari ke-60 isolat tersebut, dipilih kapang yang menghasilkan aktivitas fitase yang tinggi, yang kemudian dilakukan skrining tahap II dengan cara yang sama.

Produksi enzim

Isolat yang terpilih pada skrining tahap II diperbanyak pada medium SDA dalam tabung reaksi miring sampai berumur 5 hari. Isolat murni ini disimpan pada suhu 4°C sampai saatnya digunakan. Produksi enzim dilakukan pada medium pati jagung 8% dengan medium basal setiap 1 liter mengandung 30 g glukosa, 0,18 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g KCl, 0,2 g K_2HPO_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan 8,6 g NaNO_3 , kemudian pH diatur sampai 5.

Spora kapang berumur 5 hari disuspensi dengan air suling steril yang mengandung 2% Tween-80 dan diinokulasikan pada 50 ml medium pati jagung, lalu biakan diinkubasikan dalam inkubator bergoyang pada suhu 37°C dengan goyangan 100 rpm. Untuk mengetahui waktu optimum produksi enzim dilakukan pemanenan selama 1, 2, 3, 4, dan 5 hari.

Pengukuran aktivitas fitase

Aktivitas fitase ditentukan dengan menggunakan metode Alltech (SHIEH dan WARE, 1968) dengan beberapa penyesuaian. Dibuat campuran analitik yang mengandung 2 ml buffer asetat 1 M (pH 5,5), 2 ml substrat asam fitat (produksi TFI-Jepang) 15 mM dan 1 ml larutan enzim kasar. Sebagai kontrol disiapkan campuran yang mengandung 3 ml buffer asetat 1 M (pH 5,5) dan 2 ml substrat asam fitat 15 mM. Kedua

campuran tersebut diinkubasikan pada suhu 37°C selama 30 menit.

Sebanyak 2 ml larutan yang mengandung 0,2 ml campuran analitik, 0,8 ml TCA 20% dan 1 ml air direaksikan dengan pereaksi molibdo-vanadat (3 ml, mengandung 2,5% amonium molibdat $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ dan 0,125% amonium meta-vanadat NH_4VO_3 dalam HCl 5 M), ditambah 2 ml air dan dibiarkan selama 10 menit.

Sebagai kontrol digunakan 2 ml larutan yang mengandung 0,16 ml campuran kontrol 0,8 ml TCA 20%, 1 ml air, 0,04 ml larutan enzim kasar, direaksikan dengan 3 ml pereaksi molibdo-vanadat, ditambah 2 ml air dan dibiarkan selama 10 menit. Sementara itu, serapannya diukur pada 400 nm.

Suatu deret larutan standar yang mengandung 1,25; 2,5; 5; 10 dan 20 mM P dibuat dan direaksikan dengan pereaksi molibdo-vanadat seperti di atas. Satu unit aktivitas adalah banyaknya enzim yang dibutuhkan untuk membebaskan 1 μmol fosfor anorganik (Pi) per menit pada kondisi pengujian (HAN dan GALAGHER, 1987).

Pengukuran bobot kering biomassa

Biakan cair kapang (50 ml) pada masa inkubasi 3, 4 dan 5 hari untuk *A. ficuum* dan pada jam ke-24, -32 dan -48 untuk *A. niger* ditambah 0,5 ml natrium azida 20%, didinginkan pada suhu -11°C selama 15 menit dan dihancurkan dengan penghancur turax selama 1 menit. Sebanyak 10 ml campuran kapang dan sisa medium disentrifuse pada 12.000 rpm pada suhu 4°C . Sel kapang dipisahkan dan dicuci dengan 5 ml air suling dan disentrifuse lagi. Sebanyak 5 ml air suling ditambahkan lagi ke dalam residu sel kapang, diaduk dan dituangkan ke atas kertas saring Whatman No. 41 berdiameter 9 mm yang telah ditimbang terlebih dahulu bobotnya. Penyaringan dilakukan dengan bantuan penyaring vakum (*water jet*), dikeringkan pada suhu 105°C sampai bobotnya tetap.

Analisis protein

Analisis protein terhadap cairan enzim dilakukan dengan metode Lowry yang dimodifikasi oleh HARTREE (1972). Albumin serum sapi (*bovine serum albumin*, BSA) digunakan sebagai standar. Sebanyak 1 ml cairan contoh yang akan dianalisis proteinnya ditambah 0,9 ml larutan yang mengandung Na_2CO_3 10% dalam NaOH 0,5 N, lalu disimpan dalam penangas air pada suhu 50°C selama 10 menit. Setelah dingin, larutan lalu ditambah 0,1 ml larutan campuran $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% dan kalium-natrium tartrat 2% dalam NaOH 0,1 N. Selanjutnya, dengan cepat ditambah larutan Folin-Ciocalteu sebanyak 3 ml (larutan pokok diencerkan 15 x dengan air suling), lalu dipanaskan lagi pada suhu 50°C

C selama 10 menit. Setelah dingin, serapan dibaca pada 610 nm. Larutan standar diperlakukan sama seperti contoh.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Skrining kapang penghasil fitase

Skrining terhadap aktivitas enzim fitase telah dilakukan pada 60 isolat kapang hasil pengumpulan dari berbagai instansi dan hasil isolasi dari berbagai contoh. Hasilnya menunjukkan bahwa dari 60 isolat yang telah dikumpulkan tersebut, ternyata *Aspergillus ficuum*, *Aspergillus niger* dan *Aspergillus flavus* bereaksi positif terhadap aktivitas fitase (Tabel 3).

Tabel 3. Jenis-jenis kapang *Aspergillus* spp. dan hasil skrining fitase

Jenis <i>Aspergillus</i>	Jumlah	Fitase (+)	Fitase (-)
<i>A. ficuum</i>	2	2	-
<i>A. niger</i> (1)	40	40	-
<i>A. niger</i> (2)	2	1	1
<i>A. oryzae</i>	3	1	2
<i>A. awamori</i>	1	-	1
<i>A. candidus</i>	1	-	1
<i>A. flavus</i>	2	2	-
<i>A. terreus</i>	1	-	1
<i>A. versicolor</i>	2	-	2
<i>Aspergillus</i> sp.	6	2	4

Dari ke-60 isolat tersebut, terpilih 14 isolat yang memberi reaksi positif terhadap aktivitas fitase yang cukup tinggi sehingga dilakukan skrining tahap kedua. Dalam skrining tahap kedua ini (Tabel 4), *Aspergillus flavus* tidak termasuk ke dalam kapang yang diskriminasi, karena seperti telah diketahui, *Aspergillus flavus* termasuk ke dalam kapang penghasil aflatoxin, yang apabila digunakan sebagai kapang penghasil fitase, memerlukan tingkat kehati-hatian yang tinggi dan akan menjadikan proses produksi tidak efisien.

Parameter pengukuran pada skrining tahap kedua ini masih tetap berdasarkan pada pengukuran diameter lingkaran pertumbuhan kapang dan diameter daerah jernih yang dilakukan pada hari ke-2 dan ke-3 (Tabel 5). Berdasarkan kriteria tersebut, dan juga dari perhitungan nisbah antara keduanya, maka isolat 57 (*Aspergillus ficuum*, IPBCC 93.358 = CBS 616.78 = NRRL 320, yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi FMIPA-IPB), isolat 2 (*Aspergillus niger*, M94/18/D2, yang diperoleh dari Balitvet), isolat 58 (*Aspergillus niger*, yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi FMIPA-IPB) dan isolat 0 (*Aspergillus ficuum*, NRRL 3135) terpilih sebagai standar dan akan

diuji lebih lanjut pada medium cair yang mengandung pati jagung untuk produksi enzim secara ekstraselular.

Tabel 4. Isolat kapang terpilih untuk seleksi fitase tahap II

No. isolat	Jenis isolat	Galur isolat
0	<i>A. ficuum</i>	NRRL 3135
2	<i>A. niger</i>	M94/18/D2
3	<i>A. niger</i>	RB II/37 ⁰ C/151/a
10	<i>A. niger</i>	BR I/Isolat kandang domba, PT Hirema
12	<i>A. niger</i>	Isolat dedak, Kali Abang, Bekasi
24	<i>A. niger</i>	Isolat tanah Gunung kapur/Kb. bawang kucai, Ciampea
28	<i>A. niger</i>	Isolat tanah kebun jagung H. Muchtar, Ciampea
33	<i>A. niger</i>	Isolat roti kadaluwarsa
34	<i>A. niger</i>	Isolat burung elang
40	<i>A. niger</i>	Isolat bawang putih
50	<i>A. niger</i>	KS 04/Lodaya
57	<i>A. ficuum</i>	Lodaya IPBCC 93.258; CBS 616.78; NRRL 320
58	<i>A. niger</i>	Lodaya IPB
61	<i>A. niger</i>	M94/28/Pakan
62	<i>A. niger</i>	M94/27

Produksi enzim dan pengukuran aktivitasnya

Dalam proses produksi enzim fitase dari masing-masing kapang terpilih tersebut (Tabel 6), tampak bahwa *Aspergillus niger* (isolat 2 dan 58) lebih cepat memproduksi fitase dan mencapai aktivitas maksimum pada inkubasi 24 jam dengan aktivitas sebesar 0,750 U/ml untuk isolat 2 dan 0,648 U/ml untuk isolat 58. Hal ini berbeda dengan *Aspergillus ficuum*, yang produksi enzimnya menjadi optimum pada hari ke-4, baik untuk *Aspergillus ficuum* NRRL 3135 maupun NRRL 320, dengan aktivitas masing-masing 2,808 dan 1,520. Dalam hal ini, 1 U = 1 μ mol Pi yang dibebaskan pada kondisi "asya" selama 1 menit. Hasil ini ternyata lebih tinggi daripada hasil yang diperoleh NAIR *et al.* (1991), yang menyebutkan bahwa aktivitas fitase *Aspergillus ficuum* NRRL 3135 pada medium yang mengandung tepung Canola mencapai 0,12 mg Pi per jam/ml (= 0,065 U/ml), sedangkan aktivitas fitase yang lebih tinggi lagi dibandingkan dengan penelitian ini dihasilkan oleh SHIEH dan WARE (1968) sebesar 10 mg Pi per jam/ml (= 5,376 U/ml).

Tabel 5. Rataan \varnothing kapang, \varnothing daerah jernih dan nisbah skrining kapang penghasil fitase

Nomor Isolat	Pengukuran hari ke-2 ^{*)}			Pengukuran hari ke-3 ^{*)}		
	\varnothing kapang	\varnothing jernih	Nisbah	\varnothing kapang	\varnothing jernih	Nisbah
0	0,881 ⁶	1,762 ¹	2,021 ¹	2,671 ²	3,562 ²	1,361 ⁶
2	0,800 ⁹	1,567 ⁴	1,958 ³	2,500 ³	3,268 ⁵	1,307 ¹²
3	0,833 ⁹	1,267 ⁹	1,528 ⁷	1,900 ⁹	3,530 ³	1,331 ⁷
10	-	-	-	2,233 ⁶	2,421 ¹⁰	1,084 ¹⁴
12	0,900 ⁵	1,600 ³	1,769 ⁵	2,667 ¹	2,880 ⁷	1,080 ¹⁵
24	1,000 ³	1,467 ⁵	1,467 ⁹	2,100 ⁷	2,783 ⁹	1,325 ⁸
28	1,150 ¹	1,350 ⁸	1,174 ¹³	2,450 ⁴	3,217 ⁶	1,313 ¹⁰
33	0,800 ⁹	1,250 ¹⁰	1,579 ⁶	1,900 ⁹	3,293 ⁴	1,733 ¹
34	1,067 ²	1,367 ⁷	1,282 ¹²	2,000 ⁸	2,834 ⁷	1,417 ⁴
40	0,933 ⁴	1,267 ⁹	1,356 ¹⁰	2,100 ⁷	2,749 ¹⁰	1,309 ¹¹
50	0,833 ⁸	1,233 ¹¹	1,508 ⁸	2,100 ⁷	2,325 ¹⁴	1,107 ¹³
57	0,867 ⁷	1,683 ²	1,944 ⁴	2,367 ⁵	3,605 ¹	1,523 ²
58	0,700 ¹¹	1,400 ⁶	2,000 ²	1,550 ¹²	2,260 ¹⁵	1,458 ³
61	0,750 ¹⁰	1,000 ¹²	1,333 ¹⁰	1,800 ¹⁰	2,380 ¹²	1,322 ⁹
62	-	-	-	1,700 ¹¹	2,339 ¹³	1,376 ⁵

Keterangan: *) = Nomor superskrip adalah urutan diameter (\varnothing) dari yang terbesar sampai yang terkecil
 - = tidak ada daerah jernih

Tabel 6. Produksi enzim fitase dari *A. niger* dan *A. ficuum*: aktivitas enzim, kandungan protein dan biomassa

Nomor isolat (spesies)	Inkubasi	Aktivitas (umol Pi/ml per menit)	Protein (ug/ml)	Biomassa (g/50 ml)	Aktivitas relatif (U/g protein)
Hari ke-:					
0 (<i>A. ficuum</i>)	1	2,079	155	3,524	447,097
	2	2,208	145	3,213	507,586
	3	2,571	148	2,951	579,054
	4	2,808	158	2,521	709,091
	5	2,022	165	2,562	518,462
Jam ke-:					
2 (<i>A. niger</i>)	16	0,742	102	3,564	242,484
	24	0,750	90	3,102	277,778
	32	0,525	95	3,002	184,211
	48	0,288	99	2,965	96,970
	72	0,064	90	2,874	23,740
Hari ke-:					
57 (<i>A. ficuum</i>)	1	1,368	156	3,558	292,308
	2	1,378	145	3,004	316,782
	3	1,444	142	2,912	338,967
	4	1,520	132	2,841	383,838
	5	1,122	169	2,742	221,302
Jam ke-:					
58 (<i>A. niger</i>)	16	0,321	112	3,785	95,536
	24	0,468	95	3,265	164,221
	32	0,301	62	2,954	161,828
	48	0,274	78	2,887	117,094
	72	0,035	56	2,765	20,833

Keterangan: = 31 ug
 = 0,031 x 60 mg Pi/jam

Kandungan protein dan biomassa

Kandungan protein dalam cairan enzim berfluktuasi selama waktu pengamatan. Secara keseluruhan, kandungan protein paling tinggi pada awal pengamatan, yaitu jam ke-16 untuk *Aspergillus niger* dan hari pertama untuk *Aspergillus ficuum*. Pada saat aktivitas enzim mencapai nilai maksimum, kandungan protein itu menjadi sebesar 90 dan 95 mg/ml untuk *Aspergillus niger* isolat 2 dan 58, dan 132 mg/ml untuk *Aspergillus ficuum*. Berdasarkan kandungan protein tersebut, maka aktivitas relatif enzim fitase untuk *Aspergillus ficuum* dicapai pada hari ke-4 sebesar 19 dan 11 U/mg protein masing-masing untuk NRRL 3135 dan 320, sedangkan untuk *Aspergillus niger* pada jam ke-24 sebesar 8 dan 5 U/mg protein masing-masing untuk isolat 2 dan 58.

Kandungan biomassa terus menurun selama waktu inkubasi. Hal ini terjadi karena medium inokulasi yang digunakan mengandung pati jagung 8% sehingga terjadi menggumpalan sewaktu disterilisasi, yang berakibat mempengaruhi bobot kering biomassa. Namun demikian, berdasarkan pengamatan secara visual, kandungan pati jagung yang menggumpal terus berkurang selama waktu inkubasi, dan pada hari ke-3 menggumpalan itu hampir hilang seluruhnya sehingga medium berubah menjadi cair.

KESIMPULAN

Dari sebanyak 60 isolat yang dikoleksi dari berbagai instansi dan yang diisolasi dari berbagai sampel, setelah diskriming 2 kali, diperoleh 4 isolat kapang yang memberi aktivitas fitase tinggi. Keempat isolat itu adalah *Aspergillus ficuum* NRRL 3135 dan 320 (isolat 0 dan 57) dan *Aspergillus niger* (isolat 2 dan 58). Produksi enzim fitase dari keempat isolat tersebut yang paling tinggi diperoleh dari *Aspergillus ficuum* NRRL 3135 sebesar 2,808 U/ml atau 19 U/mg protein.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Ibu Lilis Sulastris dan Ibu Setianingsih, staf Teknisi Litkayasa dari Laboratorium Mikologi, Balai Penelitian Veteriner Bogor, yang telah banyak membantu baik dalam pembuatan medium skrining maupun dalam pengisolasian dan pengidentifikasian kapang. Penelitian ini dibiayai oleh proyek PUT II.

DAFTAR PUSTAKA

HAN, Y.W. and D.J. GALAGHER. 1987. Phosphatases production by *Aspergillus ficuum*. *J. Ind. Microb.* 1: 295-301.

- HARTREE, E.F. 1972. Determination of protein: A modification of the Lowry method that give a linear photometric response. *Analytical Biochem.* 48: 422-427.
- KNUCKLES, B.E., D.D. KUSMICKZY, M.R. GUMBMANN, and A.A. BESCHART. 1989. Effect of myo-inositol phosphate ester on *in vitro* and *in vivo* digestion of protein. *J. Food Sci.* 54: 1348-1350.
- LOLAS, M. and P. MARKAKIS. 1977. Phytase of navy beans. *J. Food Sci.* 42 (4): 1094-1097.
- MAGA, J.A. 1982. Phytase: its chemistry, occurrence, food interactions, nutritional significance and methods of analysis. *J. Agric. Food Chem.* 30 (1): 1-7.
- NAIR, V.C., J. LAFLAMME, and Z. DUVNJAK. 1991. Production of phytase by *A. ficuum* and reduction of phytic acid content in canola meal. *J. Sci. Food Agric.* 54: 355-365.
- NELSON, T.S. 1967. The utilization of phytate-phosphorus by poultry. *Poultry Sci.* 46: 862.
- NYMAN, M.E. and I. M. BJORCK. 1989. *In vivo* effects of phytic acid and polyphenols on the bioavailability of polysaccharides and other nutrient. *J. Food Sci.* 54: 1332-1335.
- RAPER, K.B. and D.I. FENNELL. 1973. *The Genus Aspergillus*. Robert E. Krieger Publishing Company, Huntington, New York, USA.
- SHIEH, T.R. and J.H. WARE. 1968. Survey of microorganisms for the production of extracellular phytase. *Appl. Microbiol.* 16 (9): 1348-1351.
- THOMPSON, J.C. 1969. Techniques for the isolation of the common pathogenic fungi. II. Air sampling, dilution plating and the ringworm fungi. *Medium 2* (4): 110-120.
- YOON, J.H., L.U. THOMPSON, and D.J. A. JENKINS. 1983. The effect of phytic acid on *in vitro* rate of starch digestibility and blood glucose response. *Am. J. Clin. Nutr.* 38: 835- 842.
- ZYLA, K. 1992. Mould phytases and their application in the food industry. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 8: 467-472.