

**ISOLASI DAN PURIFIKASI *FITASE* DARI KOTILEDON KEDELAI
[*Glycine max* (L.) Merr.] HASIL PERKECAMBAHAN**

MISWAR

*Pusat Penelitian Biologi Molekul dan Fakultas Pertanian
Universitas Jember, Jember*

RINGKASAN

Asam fitat (*myo-inositol hexakisphosphate*) merupakan bentuk utama unsur P yang terdapat dalam biji legum dan sereal. Selama proses perkecambahan, unsur P dari asam fitat digunakan sebagai sumber nutrisi untuk pertumbuhan dan perkembangan kecambah. Hidrolisis asam fitat dalam biji oleh aktivitas *fitase* akan melepaskan inositol dan fosfat bebas. Tidak adanya aktivitas *fitase* dalam saluran pencernaan ternak non-ruminansia menyebabkan mineral dan unsur nutrisi lain yang terikat pada asam fitat tidak dapat diserap. Penggunaan *fitase* untuk menghidrolisis asam fitat meningkatkan daya serap usus terhadap mineral dan unsur nutrisi lainnya. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas *fitase* pada kotiledon kedelai hasil perkecambahan. Biji kedelai ditumbuhkan pada media kapas basah selama 14 hari dan setiap 2 hari kotiledon dipanen. Hasil penelitian menunjukkan bahwa biji kedelai var. Bromo yang dkecambahkan 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 ($35,96 \text{ ug Pi jam}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$) dengan nilai k_m dan V_{maks} masing-masing sebesar 0.221 mM asam fitat dan $0.383 \text{ ug Pi jam}^{-1}$.

Kata kunci : *Fitase*, asam fitat, kedelai, perkecambahan, fosfor

**ISOLATION AND PURIFICATION OF FITASE FROM COTYLEDON OF
GERMINATING SOYBEAN [*Glycine max* (L.) Merr.]**

SUMMARY

Phytic acid (*myo-inositol hexakisphosphate*) is the major storage form of phosphorus the in seeds of legume and cereal. During germination, P-phytic acid is used as a source of nutrients for growth and development of seedlings. Hydrolysis of seed phytic acid by the activity of phytase will release inositol and free phosphate. The absence of the activity of phytase in the non-ruminant digestive tract causes minerals and other nutrients bound in phytic acid not be absorbed. The use of phytase to hydrolyze phytic acid increases the capacity of intestines to absorb minerals and other nutrients. The objective of this research is to study the activity of fitase from cotyledon of germinating soybean. Soybean seeds were grown on the wet cotton for 14 days, and the cotyledon were harvested every 2 days. The research results showed that Soybean seeds var. Bromo germinated for 10 days produce the highest level of phytase activity. Purification of cotyledon phytase by using ammonium sulphate and DEAE-celulose obtained three forms of phytase. Phytase 2 had the highest specific activity (35.96 ug Pi

hour⁻¹mg protein⁻¹), K_m and V_{max} is 0.221 mM of phytic acid and 0.383 μ g Pi hour⁻¹, respectively.

Keywords : Phytase, phytic acid, soybean, germination, phosphorus

PENDAHULUAN

Biji tanaman sereal, legum, dan *oilseed plant* banyak digunakan sebagai sumber nutrisi yang penting bagi manusia dan hewan. Selain sebagai sumber karbohidrat, protein, dan lemak, biji-bijian tersebut juga bertindak sebagai sumber mineral yang penting bagi pertumbuhan seperti P, Ca, Fe, dan Zn (Morris, 1986). Biji-bijian tersebut banyak mengandung senyawa anti-nutrisi (asam fitat) yang menyebabkan nilai nutrisi atau nilai gizi biji-bijian sereal dan legum bagi manusia dan ternak menjadi rendah. Asam fitat merupakan bentuk utama unsur fosfor (P) yang terdapat pada biji sereal, legum, *oilseed plant*, dan polen (Quan *et al.*, 2001; Wilcox *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2003), dan dapat mencapai 50-80% dari total P (Li *et al.*, 1997). Adanya asam fitat menyebabkan beberapa mineral dan protein menjadi tidak terlarut sehingga tidak dapat diserap oleh usus manusia dan ternak non-ruminansia (Liu *et al.*, 1997). Secara alami, fitat membentuk kompleks dengan beberapa mineral (P, Zn, Fe, Mg, Ca), protein, dan asam amino (Nagashima *et al.*, 1999; Wyss *et al.*, 1999; Kerovuo, 2000; Quan *et al.*, 2001). Asam fitat juga dapat mengikat beberapa enzim seperti *amilase*, *tripsin*, *pepsin* dan *β -galaktosidase* sehingga menurunkan aktivitasnya (Inagawa *et al.*, 1987)

Tingginya konsumsi produk dari biji sereal dan legum oleh manusia dan ternak non ruminansia dapat memberikan sumbangan pada pencemaran lingkungan (Viveros *et al.*, 2000). Hal ini disebabkan karena unsur P yang terikat pada asam fitat tidak dapat diserap dan terbuang bersama feses sehingga mencemari lingkungan. Kandungan asam fitat tertinggi di antara tanaman sereal terdapat pada jagung (0,83-2,22%), sedangkan di antara tanaman legum terdapat pada kacang koro (5,92-9,15%) (Reddy *et al.*, 1989). Tingginya fitat dalam biji-bijian tersebut menyebabkan rendahnya pemanfaatan unsur P oleh ternak non ruminansia. Satu cara untuk meningkatkan efisiensi pemanfaatan unsur P dari fitat adalah dengan penggunaan *fitase* (*phytase*).

Fitase (EC 3.1.3.8; *myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase*) merupakan kelompok enzim *phosphatase* yang mampu menghidrolisis asam fitat menjadi *monophosphate* anorganik, *myo-inositol phosphate* rendah (*lower myo-inositol phosphate*), dan *myo-inositol* bebas (Kerovuo, 2000; Quan *et al.*, 2002). Enzim ini

dapat dihasilkan oleh mikroorganisme (bakteri, jamur, *yeast*), jaringan hewan dan tanaman. Beberapa jenis tanaman yang dapat menghasilkan *fitase* antara lain jagung, kedelai, padi, kapas, *wheat*, dan *barley*. Pada biji legum dan sereal yang berkecambah, fitat dihidrolisis oleh *fitase* untuk menyediakan unsur P. Besarnya aktivitas *fitase* dalam kotiledon tergantung pada tingkat perkecambahan. Dalam penelitian ini diisolasi *fitase* dari kotiledon kedelai dari berbagai umur kecambah.

BAHAN DAN METODE

Bahan Tanam

Biji kedelai varietas Bromo digunakan untuk menghasilkan *fitase*. Biji dikecambahkan pada media kapas yang dibasahi dengan air selama 14 hari, setiap 2 hari kotiledon diambil untuk diekstrak fitasenyanya.

Ekstraksi *Fitase*

Fitase dari kotiledon kedelai diekstraksi berdasarkan metode dari Hegeman dan Grabau (2001). Kotiledon sebanyak 3 g digerus dengan menggunakan *mortar-stumpler* dingin, lalu dihomogenasi dengan larutan ekstraksi yang mengandung 100 mM Na-asetat (pH 5,5); 20 mM CaCl₂; 1 μM DTT; dan 0,5 μM PMSF. Homogenat disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm, 4^oC selama 15 menit. Supernatan (*crude extract*) diambil dan digunakan sebagai sumber *fitase* untuk analisis selanjutnya.

Purifikasi *Fitase*

Purifikasi *fitase* dilakukan dengan menggunakan metode dari Hegeman dan Grabau (2001). *Fitase crude extract* dipresipitasi dengan amonium sulfat pada konsentrasi 0-50%, lalu disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm, 4^oC selama 10 menit. Supernatan diambil, kemudian dipresipitasi lagi dengan amonium sulfat pada konsentrasi 50-80%. Hasil presipitasi disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm, 4^oC selama 20 menit. Supernatan dibuang, endapan protein *fitase* dilarutkan dengan larutan 100mM Na-asetat (pH 5,5) dan didialisis. Larutan *fitase* hasil dialisis difraksinasi dengan kolom DEAE-celullose, dan kemudian diuji aktivitasnya.

Uji Aktivitas Fitase

Aktivitas *fitase* diuji berdasarkan jumlah P yang dilepaskan dari fitat selama reaksi dengan menggunakan metode Berka *et al.* (1998). Substrat sebanyak 200 μL (0,5 mM asam fitat dalam 100 mM sodium asetat) diinkubasi pada suhu 50°C selama 5 menit. Setelah 5 menit, 100 μL larutan *fitase* dimasukkan dan diinkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 300 μL 15% TCA, lalu disentrifugasi selama 5 menit. Supernatan sebanyak 350 μL ditambahi 1 mL *color reagent* yang terdiri atas 6N H_2SO_4 , 2,5% Ammonium heptamolibdat; dan 10% asam askorbat lalu diinkubasi pada suhu 50°C selama 20 menit. Intensitas warna diukur dengan spektrofotometer pada $\lambda = 690 \text{ nm}$.

Penentuan Konsentrasi Protein Terlarut

Konsentrasi protein terlarut ditentukan dengan metode Bradford (1976) menggunakan CBB-250 G. *Bovine serum albumine* (BSA) digunakan sebagai protein standar.

Ekstraksi dan Penentuan Konsentrasi P-anorganik Kotiledon

Penentuan kandungan P-anorganik kedelai dilakukan dengan metode Raboy *et al.* (1984). Sampel kotiledon kedelai digerus dan dihomogenasikan dengan 3 mL larutan 0,4 N HCL. Homogenat disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit, supernatan diambil untuk diukur konsentrasi P-anorganiknya. Sebanyak 100 μL larutan hasil ekstraksi ditambahi 400 μL H_2O dan 500 μL *color reagent*, lalu diinkubasi pada suhu 50°C selama 20 menit. Intensitas warna diukur dengan spektrofotometer pada $\lambda=690 \text{ nm}$, konsentrasi P-anorganik dihitung dengan persamaan regresi kurva standar P.

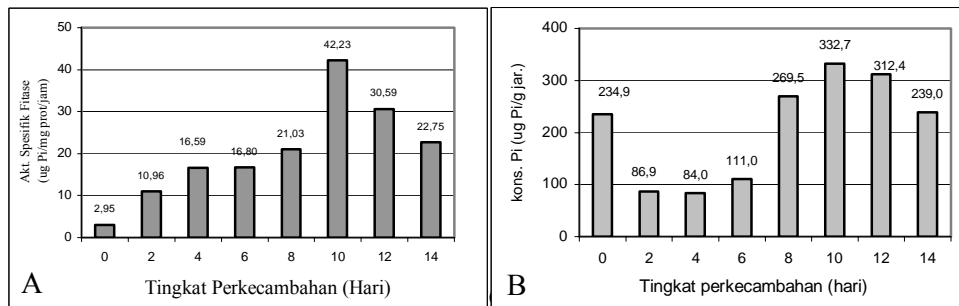
Penentuan Nilai K_m dan V_{maks} .

Nilai K_m dan V_{maks} *fitase* ditentukan dengan menggunakan persamaan Lineweaver-Burk. Untuk mendapatkan nilai K_m dan V_{maks} , *fitase* direaksikan dengan berbagai konsentrasi yang berbeda.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hubungan Tingkat Perkecambahan dengan Aktivitas *Fitase* dan konsentrasi P anorganik kotiledon

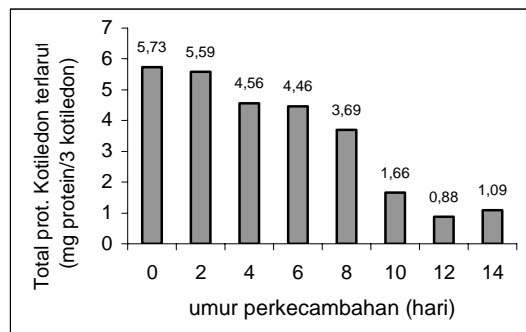
Unsur P yang terikat pada asam fitat di dalam biji kedelai akan dihidrolisis oleh *fitase* sehingga membebaskan P dan digunakan untuk proses perkecambahan. Perubahan aktivitas spesifik *fitase* dan konsentrasi P-anorganik kotiledon kedelai selama 14 hari perkecambahan adalah seperti yang terlihat pada Gambar 1. Semakin tua umur kecambah maka aktivitas *fitase* dan konsentrasi P anorganik dalam kotiledon juga semakin besar dan mencapai puncak pada umur kecambah 10 hari.



Gambar 1. Kotiledon pada berbagai tingkat perkecambahan kedelai

Perubahan Kandungan Protein Kotiledon

Dalam biji kedelai, protein cadangan akan dihidrolisis menjadi asam amino untuk membentuk jenis protein baru. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kandungan protein kotiledon semakin menurun dengan bertambahnya umur kecambah sampai dengan hari ke 12 (Gambar 2). Pada hari ke 14, kandungan protein kotiledon meningkat. Diduga setelah hari ke 12 kecambah kedelai telah memasuki fase *autotrof* dan tidak lagi memanfaatkan cadangan makanan yang terdapat di kotiledon.



Gambar 2. Perubahan kandungan protein terlarut kotiledon pada umur perkecambahan yang berbeda

Purifikasi *Fitase*

Fitase crude extract dari kotiledon kedelai yang dikecambahkan selama 10 hari dipresipitasi dengan amonium sulfat (50-80%), kemudian difraksinasi dengan kolom DEAE-celullose. Hasil fraksinasi menunjukkan bahwa terdapat 3 kelompok fraksi yang mempunyai aktivitas *fitase* yaitu kelompok I (fraksi no. 21-23), kelompok 2 (fraksi no. 26-28), dan kelompok 3 (fraksi no. 52-58). Hal ini menunjukkan bahwa ada tiga macam *fitase* yang terdapat pada kotiledon kedelai var. Bromo seperti yang terlihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Aktivitas spesifik *fitase* hasil fraksinasi dengan DEAE-celullose dan tingkat kemurnian (purifikasi)

Hasil purifikasi	Total protein (μg)	Total akt. relatif ($\mu\text{g Pi/jam}$)	Total AS ($\mu\text{g Pi/jam/mg prot}$)	Tingkat purifikasi
CE	377840,13	1150,06	3,04	1,00
<i>fitase</i> 1	27727,19	290,18	10,47	3,44
<i>fitase</i> 2	28531,73	1025,9	35,96	11,83
<i>fitase</i> 3	42532,99	684,06	16,08	5,29

Keterangan : CE (*crude extract*), AS (aktivitas spesifik), *Fitase* 1,2, dan 3 adalah hasil purifikasi dengan kolom DEAE-celullose.

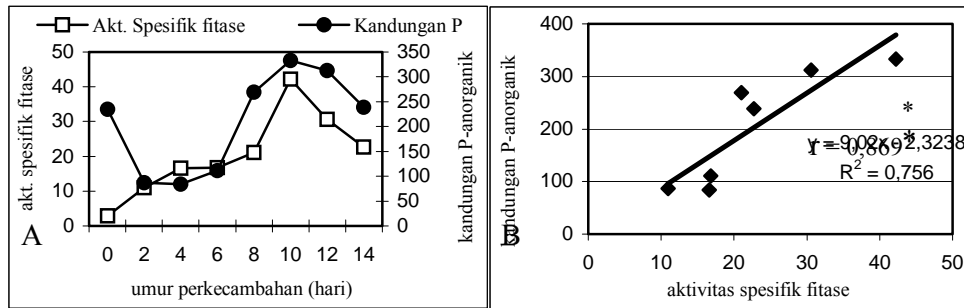
Karakter Kinetik *Fitase*

Nilai K_m dan V_{maks} suatu enzim sangat menentukan pembentukan kompleks antara enzim dan substrat, sehingga proses konversi substrat menjadi produk dapat berlangsung. Hasil dalam penelitian ini mendapatkan nilai K_m *fitase* 2 sebesar 0.221 mM dengan V_{maks} mencapai 0.383 $\mu\text{gPi/jam}$.

Pembahasan

Dalam biji kedelai, senyawa asam fitat berfungsi sebagai cadangan unsur P untuk mendukung proses perkecambahan, yang jumlahnya dapat mencapai 60% dari total P (Hitz *et al.*, 2002). Penggunaan biji kedelai sebagai salah satu komponen makanan ternak, khususnya non-ruminasia, menyebabkan unsur P yang terikat pada asam fitat tidak dapat diserap. Di samping unsur P, asam fitat juga mengikat mineral Zn, Fe, Mg, Ca, dan protein. Mineral dan senyawa lain yang terikat pada asam fitat dapat diserap oleh ternak non ruminansia jika terlepas dari asam fitat. *Fitase* merupakan enzim yang mampu menghidrolisis asam fitat, sehingga mineral yang terikat dilepaskan.

Dalam penelitian ini, berhasil diisolasi dan dipurifikasi *fitase* dari kotiledon kedelai hasil pekecambahan. Besarnya aktivitas spesifik *fitase* pada kotiledon kedelai sangat tergantung pada umur perkecambahan (Gambar 1A). Hal ini berkaitan dengan semakin besarnya kebutuhan akan unsur P untuk mendukung pertumbuhan dengan semakin meningkatkannya tingkat perkecambahan (Gambar 3A).



Gambar 3. Hubungan antara aktivitas *fitase* dengan kandungan P-anorganik (A) kotiledon kedelai pada berbagai tingkat perkecambahan yang berbeda dan persamaan regresi (B).

Besarnya hubungan antara aktivitas *fitase* dengan kandungan P-anorganik (r) adalah sebesar 0,869. Hal ini menunjukkan bahwa kandungan P-anorganik pada kotiledon kedelai yang sedang berkecambah dipengaruhi oleh aktivitas *fitase*. Selama dalam periode perkecambahan, hidrolisis asam fitat oleh *fitase* menyediakan nutrisi untuk pertumbuhan yang cepat (Hegeman dan Grabau, 2001). Aktivitas *fitase* dan kandungan P-anorganik kotiledon setelah hari ke 10 mengalami penurunan. Kemungkinan setelah hari ke 10 kedelai telah memasuki fase *autotrof* sehingga unsur-unsur nutrisi yang diperlukan didapat dari penyerapan oleh akar.

Fitase selain berperan dalam proses perkecambahan biji juga dapat digunakan dalam teknologi pangan dan pakan. Untuk mendapatkan *fitase* dengan aktivitas tinggi dari kedelai, biji harus dikecambahkan lebih dahulu selama 10 hari, seperti yang juga dilakukan oleh Hegeman dan Grabau (2001). Hasil dalam penelitian ini menunjukkan bahwa kotiledon kedelai mempunyai tiga macam *fitase* dengan aktivitas yang berbeda-beda (Tabel 1). Hegeman dan Grabau (2001) mendapatkan 2 bentuk *fitase* dari kotiledon kedelai yang dikecambahkan selama 10 hari, sedangkan pada akar jagung terdapat 3 bentuk *fitase* (Hubel dan Beck, 1996).

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ada tiga bentuk *fitase* yang terdapat pada kotiledon kedelai. Untuk mendapatkan *fitase* dari kedelai dalam

jumlah yang banyak, biji harus dikecambahkan terlebih dahulu selama 10 hari. Hasil purifikasi menunjukkan bahwa *fitase 2* mempunyai aktivitas spesifik tertinggi jika dibandingkan dengan *fitase* yang lain (*fitase 1* dan *3*).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada kepala Pusat Penelitian Biologi Molekul Universitas Jember atas fasilitas laboratorium dan Eni Fidiyawati yang telah membantu terlaksananya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Berka, R.M., M.W. Rey, K.M. Brown, T. Byun and A.V. Klotz. 1998. Molecular characterization and expression of a phytase gene from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64** : 4423-4427
- Bradford, M. M., 1976, A Rapid and Sensitive Method for The Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing The Principle of Protein Dye Binding, *Anal. Biochem.* **72** : 61 – 67
- Hegeman, C.E., and E.A. Grabau. 2001. A novel phytase with sequence similarity to purple acid phosphatase is expressed in cotyledons of germinating soybean seedlings. *Plant Physiol.* **126** : 1598-1608
- Hitz, W. D. ; T. J. Carlson; P. S. Kerr; and S. A. Sebastian. 2002. Biochemical and Molecular Characterization of a Mutation That Confers a Decreased Raffinosaccharide and Phytic Acid Phenotype on Soybean Seed. *Plant Physiol.* **128**: 650-660.
- Hubel, F., and E. Beck. 1996. Purification, characterization, and localization of enzyme activity and its putative substrate. *Plant Physiol.* **112** : 1429-1436.
- Inagawa, J., I. Kiyosawa, and T. Nagasawa. 1987. Effect of phytic acid on the hydrolysis of lactose with beta-galactosidase. *Agric. Biol. Chem.* **51** : 3027-3032.
- Kerovuori, J. 2000. A novel phytase from *Bacillus*: Characterization and production of the enzyme, Ph.D dissertation, Univ. Helsinki, Finland
- Li, M.; M. Osaki; I. M. rao; and T. Todano. 1997. Secretion of Phytase from the Root of Several Plant Under Phosphorus-Deficient Conditions. *Plant and Soil.* **195** :161-169.
- Liu, J., D.R. Ledoux and T.L. Veum. 1997. In vitro procedure for predicting the enzymatic dephosphorylation of phytate in corn-soybean meal diets for growing swine. *J. Agric. Food Chem.* **45**: 2612-2617
- Morris, E.R. 1986. Phytate and dietary mineral bioavailability. In: Phytic acid chemistry and applications. E. Graf, Ed. Pilatus Press, Minneapolis, USA
- Nagashima, T., T. Tange and H. Anazawa. 1999. Dephosphorylation of phytate by using the *Aspergillus niger* phytase with a high affinity for phytate. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4682-4684

- Quan, C.S., L.H. Zhang, Y.J. Wang and Y. Ohta. 2001. Production of phytase in a low phosphate medium by a novel yeast *Candida krusei*. J. Biosci. Bioeng. **92** : 154-160.
- Quan, C.S., S.D. Fan, L.H. Zhang, Y.J. Wang and Y. Ohta. 2002. Purification and properties of a phytase from *Candida krusei* WZ-001. J. Biosci. Bioeng. **94** : 419-425
- Raboy, V., D. Dickinson, and F. Below. 1984. Variation in seed total P : phytic acid, zinc, calcium, magnesium, and protein among lines of *Glycine max* and *G. Sojae*. Crop Sci. **24** : 431-434
- Reddy, N.R., M.D. Pierson, S.K. Sathe, and D.K. Salunkhe. 1989. Phytates in cereals and legumes. CRC Press, Boca Raton, FL
- Shi, J., H. Wang. Y. Wu. J. Hazebroek. R.B. Meeley and D.S. Ertl. 2003. The maize low phytic acid mutant lpa 2 is caused by mutation in an inositol phosphate kinase gen. Plant Physiol. **131**: 507-515
- Viveros, A., C. Centeno, A. Brenes, R. Canales, and A. Lozano. 2000. Phytase and acid phosphatase activities in plant feedstuffs. J. Agric. Food. Chem. **48** : 4009-4013
- Wilcox, J.R., G.S. Premachandra, K.A. Young, and V. Raboy. 2000. Isolation of high seed inorganic P, low phytate soybean mutants. Crop Sci. **40** : 1601-1605
- Wyss, M., L. Pasamontes, A. Friedlein, R. Remy, M. Tessier, A. Kronenberger, A. Middendorf, M. Lehmann, L. Schnoebelen, U. Rothlisberger, E. Kuszniir, G. Whl, F. Muller, H.W. Lahm and K. Vogel. 1999. Biophysical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases) : molecular size, glycosylation pattern, and engineering of proteolytic resistance. Appl. Environ. Microbiol. **65** : 359-366.