



**PURIFIKASI PARSIAL DAN KARAKTERISASI
ENZIM FITASE DARI *Candida tropicalis* TKD3**

Skripsi

disusun sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Sarjana Sains
Program Studi Biologi

oleh

Umi Listiyani
4411415030

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG**

2019

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi yang berjudul “Purifikasi Parsial dan Karakterisasi Enzim Fitase dari *Candida tropicalis* TKD3” merupakan hasil penelitian saya dengan arahan dosen pembimbing. Sumber informasi atau kutipan dari karya yang diterbitkan telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam daftar pustaka dibagian akhir skripsi ini. Skripsi ini belum pernah diajukan untuk memperoleh gelar dalam program sejenis di Perguruan Tinggi manapun.

Semarang, 26 November 2019



Umi Listiyani
NIM. 4411415030

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul

“Purifikasi Parsial dan Karakterisasi Enzim Fitase dari *Candida tropicalis*
TKD3”

disusun oleh

Umi Listiyani

4411415030

telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Skripsi FMIPA Universitas Negeri
Semarang pada tanggal 26 November 2019.

Panitia Ujian

Ketua

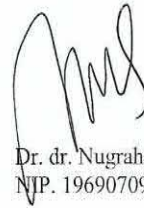


Penguji I



Prof. Dr. Retno Sri Iswari, S.U.
NIP. 195202071979032001

Sekretaris



Dr. dr. Nugrahaningsih W.H., M.Kes.
NIP. 196907091998032001

Penguji II



Dr. Pramesti Dewi, M.Si.
NIP. 196509081989032001

Penguji III/Pembimbing



Dra. Ely Rudyatmi, M.Si.
NIP. 196205241987102001

MOTTO DAN PERSEMBAHAN

MOTTO

Memperbaiki diri menjadi lebih baik sangat dibutuhkan dalam kehidupan. Setiap orang pernah memiliki masa lalu, akan tetapi masa lalu hanyalah sebuah memori yang tidak akan bisa untuk diulang. Hal paling utama yang harus kita lakukan adalah menjadikan masa lalu sebagai acuan hidup yang lebih baik. Jangan pernah melihat masa lalu dengan penyesalan dan jangan pernah melihat masa depan dengan ketakutan, akan tetapi lihatlah di sekitar kita dengan penuh kesadaran. Setidaknya dengan mencoba kita tahu bagaimana rasanya berjuang, meskipun terkadang sulit dan kegagalan menghampiri, akan tetapi kita harus tetap optimis dan yakin bahwa semua akan indah pada waktunya. Intinya selalu berusaha diiringi dengan doa. *“Sesungguhnya Allah tidak akan mengubah keadaan suatu kaum, sebelum kaum itu sendiri mengubah apa yang ada pada diri mereka” (QS. Ar-Ra’d [13]: 11).*

PERSEMBAHAN

Untuk Allah SWT
Untuk Nabi Muhammad SAW dan keluarganya
Untuk kedua orang tua tercinta
Untuk Nenek tercinta
Untuk Kakak dan Adik tersayang
Untuk keponakan-keponakanku tersayang
Untuk keluarga besar Bani Saman
Untuk Bapak dan Ibu Dosen Biologi
Untuk semua sahabat dan teman seperjuanganku
Untuk keluarga besar Pondok Pesantren Assalafy Putri Alasror
Untuk keluarga kos Samawa dan Happy kos
Untuk Almamaterku Universitas Negeri Semarang

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, taufik, hidayah dan inayahnya serta tidak lupa sholawat dan salam senantiasa tercurahkan kepada junjungan kita Nabi Agung Muhammad SAW, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Purifikasi Parsial dan Karakterisasi Enzim Fitase dari *Candida tropicalis* TKD3”. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains Program Studi Biologi Universitas Negeri Semarang.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bimbingan serta dukungan dari berbagai pihak, oleh sebab itu penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

1. Kedua orang tua dan keluarga yang selalu menjadi motivasi untuk terus berusaha.
2. Rektor Universitas Negeri Semarang yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk menyelesaikan studi di Universitas ini.
3. Dekan FMIPA Universitas Negeri Semarang yang telah memberikan izin penelitian sehingga dapat menyelesaikan penulisan skripsi ini.
4. Ketua Jurusan Biologi yang telah memberikan kemudahan dan kelancaran dalam penyusunan skripsi.
5. Dra. Ely Rudyatmi, M.Si sebagai dosen pembimbing yang telah memberikan bimbingan, arahan, masukan, dan motivasi dengan penuh kesabaran kepada penulis.
6. Lusty Istiqomah, S.Pt, M.Biotech sebagai pembimbing lapangan yang telah memberikan bimbingan, arahan, masukan, dan motivasi dengan penuh kesabaran kepada penulis.
7. Prof. Dr. Retno Sri Iswari, S.U. selaku dosen penguji pertama yang telah memberikan masukan dan motivasi kepada penulis.
8. Dr. Pramesti Dewi, M.Si. selaku dosen penguji kedua yang telah memberikan masukan dan motivasi kepada penulis.
9. Bapak/Ibu dosen dan karyawan FMIPA Universitas Negeri Semarang khususnya jurusan Biologi atas segala bantuan yang diberikan.

10. Kepala Balai Penelitian Teknologi Bahan Alam LIPI Yogyakarta yang telah memberikan izin kepada penulis untuk melaksanakan penelitian skripsi di BPTBA LIPI Yogyakarta.
11. Seluruh pegawai Laboratorium Pakan dan Mikrobiologi BPTBA LIPI Yogyakarta yang telah memberikan izin menjadi tempat penelitian dan membimbing serta mengarahkan selama penelitian.
12. Teman-teman seperjuangan dan semua pihak yang telah membantu selama penelitian dan penyusunan skripsi ini, yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis meminta maaf atas keterbatasan dalam penyusunan skripsi ini mulai dari penulisan, data-data yang disajikan ataupun pembahasan dalam skripsi ini. Penulis juga menyadari bahwa skripsi ini belum sepenuhnya sempurna, untuk itu penulis menerima kritik dan saran dari pembaca demi kesempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat dan menambah wawasan bagi pembaca. Terimakasih.

Semarang, 26 November 2019

Penulis

Umi Listiyani

ABSTRAK

Listiyani, U. 2019. *Purifikasi Parsial dan Karakterisasi Enzim Fitase dari Candida tropicalis TKD3*. Skripsi, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang. Pembimbing Utama Dra. Ely Rudyatmi, M.Si. dan Pembimbing Pendamping Lusty Istiqomah, S.Pt, M.Biotech.

Fitase ditemukan didalam tempe kedelai. Pada tempe kedelai banyak mengandung kapang *Rhizopus oligosporus* dan berbagai khamir. Salah satu khamir yaitu *Candida tropicalis*. Isolat *C. tropicalis* telah diketahui menghasilkan fitase ekstraseluler dengan aktivitas sebesar 6,572 U/mL. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui morfologi *C. tropicalis* TKD3, mengetahui karakter enzim fitase *C. tropicalis* TKD3 hasil purifikasi parsial pada variasi suhu inkubasi dan pH buffer, mengetahui; 1. aktivitas enzim fitase; 2. kadar protein terlarut; dan 3. aktivitas spesifik enzim fitase *C. tropicalis* TKD3 hasil purifikasi Parsial. Populasi pada eksperimen ini berupa mikroorganisme yang diisolasi dari tempe kedelai. Sample berupa enzim kasar fitase *C. tropicalis* TKD3. Variabel terikat berupa aktivitas enzim fitase, kadar protein terlarut dan aktivitas spesifik enzim fitase. Variabel bebas berupa suhu inkubasi dan pH buffer. Tahapan penelitian ini meliputi pengamatan morfologi isolat *C. tropicalis* TKD3, purifikasi parsial enzim fitase *C. tropicalis* TKD3, karakterisasi enzim fitase hasil purifikasi parsial, pengujian aktivitas enzim fitase, penentuan kadar protein terlarut dan penentuan aktivitas spesifik enzim fitase. Morfologi *C. tropicalis* ditentukan dengan pengamatan makroskopis dan mikroskopis serta dianalisis secara deskriptif. Aktivitas enzim fitase dan kadar protein terlarut ditentukan dengan spektrofotometer dan dianalisis dengan uji T. Aktivitas spesifik enzim fitase ditentukan dengan panduan Olstorpe dan dianalisis dengan uji T. Bentuk koloni *Candida tropicalis* TKD3 sirkuler, warna putih susu, elevasi convex, tepian entire, permukaan *smooth* dan mengkilat. Bentuk sel basilus dan bertunas. Aktivitas enzim fitase hasil purifikasi parsial *C. tropicalis* TKD3 dalam sediaan cair optimum pada suhu inkubasi 55 °C dan pH buffer 4. Aktivitas enzim fitase dan kadar protein terlarut enzim fitase hasil purifikasi parsial lebih tinggi secara signifikan daripada enzim kasarnya, akan tetapi aktivitas spesifik enzim fitase hasil purifikasi parsial sama dengan enzim kasarnya. Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa morfologi koloni dan sel *C. tropicalis* TKD3 belum dapat dibedakan secara spesifik dengan media *Chloramphenicol Yeast Glucose (CYG) agar*. Enzim fitase *C. tropicalis* TKD3 hasil purifikasi parsial menghasilkan aktivitas optimum. Aktivitas enzim fitase, kadar protein terlarut dan aktivitas spesifik enzim fitase

Kata kunci : *Candida tropicalis*, fitase, karakterisasi, purifikasi, unggas

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	I
PERNTAAN KEASLIAN SKRIPSI	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
MOTTO DAN PERSEMBAHAN	iv
PRAKATA	v
ABSTRAK	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Penegasan Istilah	3
1.4 Tujuan Penelitian	4
1.5 Manfaat Penelitian	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Fitase	5
2.2 <i>Candida tropicalis</i>	7
2.3 Tempe sebagai Sumber <i>C. tropicalis</i>	8
2.4 Purifikasi Parsial	9
2.5 Karakterisasi Enzim	12
2.6 Kerangka Berpikir	13
2.7 Hipotesis	14
BAB 3 METODE PENELITIAN	
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	15
3.2 Jenis Penelitian	15
3.3 Variabel Penelitian	15

3.4 Populasi dan Sample	15
3.5 Prosedur Penelitian	15
3.6 Teknik Analisis Data	22
BAB 4 PEMBAHASAN	
4.1 Hasil Penelitian	23
4.2 Pembahasan	26
DAFTAR PUSTAKA	35
LAMPIRAN	42

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.4 Aktivitas Enzim Fitase, Kadar Protein Terlarut, Aktivitas Spesifik Enzim Fitase Kasar dan Hasil Purifikasi Parsial <i>C. tropicalis</i> TKD3 pada Suhu dan pH Optimum	25

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Hidrolisis Fitat oleh Fitase	7
2.2 Prinsip <i>Salting Out</i>	10
2.3 Pengaruh Kadar Garam terhadap Kelarutan Protein	11
2.4 Kerangka Berpikir	13
4.1 Struktur <i>C. tropicalis</i> TKD3	23
4.2 Aktivitas Enzim Fitase Hasil Purifikasi Parsial <i>C. tropicalis</i> TKD3 pada Variasi Suhu Inkubasi	24
4.3 Aktivitas Enzim Fitase Hasil Purifikasi Parsial <i>C. tropicalis</i> TKD3 pada Variasi pH Buffer	25

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Dokumentasi Kegiatan Penelitian	42
2. Hasil Identifikasi Biokimiawi Isolat TKD3 dengan Api 20 AuX	45
3. Hasil Analisis Molekuler Isolat TKD3 dengan Sekuen Gen 28 S rRNA	46
4. Tahapan Pembuatan Kurva Standar KH_2PO_4	47
5. Tahapan Pembuatan Kurva Standar Protein BSA	49
6. Hasil Uji t-Tes: <i>Two-Sample Assuming Equal Variences</i>	51

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Fitase merupakan salah satu enzim yang tergolong dalam kelompok phosphatase, yang mampu menghidrolisis senyawa fitat (*myo-inositol (1,2,3,4,5,6) hexakiphosphatase*) menjadi *myo-inositol* dan fosfat organik (Lamid *et al.*, 2014). Fitase banyak dimanfaatkan dalam industri pakan ternak, khususnya unggas. Sekitar 50-80% pakan ternak unggas berada dalam bentuk fitat atau asam fitat. Asam fitat merupakan bentuk penyimpanan fosfor yang terbesar pada tanaman biji-bijian, serelia dan leguminosa yang tidak dapat dihidrolisis dalam saluran pencernaan ternak monogastrik (Thyagarajan *et al.*, 2014; Tungala *et al.*, 2013). Kandungan asam fitat dalam beberapa bahan pakan yang sering digunakan sebagai bahan pakan penyusun ransum unggas adalah sebagai berikut, jagung (0,186%), bungkil kedelai (0,395%), *distiller's dried grains with solubles* (DDGS) (0,257%), tepung limbah roti (0,192%), gandum (0,251%) dan tepung kanola (0,695%). Dedak padi termasuk bahan pakan yang mengandung asam fitat tinggi yaitu mencapai 6,63% (Hidayat *et al.*, 2014).

Ternak monogastrik seperti unggas, tidak mampu mendegradasi senyawa fitat yang mengikat fosfor dan mineral lain seperti Ca, Fe, Zn dan Mg karena tidak adanya enzim fitase pada saluran pencernaannya, sehingga menyebabkan rendahnya ketersediaan unsur fosfor pada pakan ternak unggas. Rendahnya kandungan fosfor dan mineral lainnya dalam tubuh ternak unggas, membuat produktivitas ternak unggas menurun dan pertumbuhannya juga terhambat. Pada formulasi pakan, umumnya ditambahkan fosfor dalam bentuk fosfat agar ketersediaanya cukup untuk ternak monogastrik (Yanuartono, 2017). Dampak buruk dari anti nutrisi berupa asam fitat ini, dapat dikurangi dengan menambahkan enzim penghidrolisis asam fitat yaitu fitase ke dalam pakan ternak unggas. Penambahan enzim fitase ini akan mengurangi aktivitas asam fitat dalam saluran pencernaan ternak unggas, sehingga bahan pakan lebih efisien untuk dicerna (Widjaja *et al.*, 2011).

Fitase telah banyak diisolasi dari berbagai mikroorganisme seperti khamir (Santoso, 2013). Salah satu khamir penghasil fitase adalah *C. tropicalis*. Aktivitas fitase yang berasal dari *C. tropicalis* telah dilaporkan oleh beberapa peneliti. Nakamura *et al.* (2000), melaporkan bahwa *C. tropicalis* CBS 94 menghasilkan fitase dengan aktivitas sebesar 20 U/mL pada media YPGlu2% dengan kondisi suhu 60°C dan pH 4-5. Das dan Ghosh (2014), melaporkan bahwa *C. tropicalis* yang diisolasi dari saluran pencernaan ikan dan diproduksi dengan fermentasi padat (SsF) menggunakan substrat bungkil kedelai menghasilkan fitase sebesar 30,41 U/g.

Candida tropicalis dapat ditemukan dalam makanan (Zuza, 2017). Salah satunya berasal dari makanan fermentasi yaitu tempe kedelai (Lim, 2011). Tempe kedelai adalah produk berbentuk padatan kompak berwarna putih, yang diperoleh dari kedelai kupas yang sudah direbus dan difermentasi (Badan Standar Nasional, 2015). Struktur yang kompak disebabkan oleh miselia-miselium jamur yang menghubungkan antara biji-biji kedelai tersebut. Terjadinya degradasi komponen-komponen dalam kedelai juga dapat menyebabkan terbentuknya tekstur yang padat setelah fermentasi (Razie, 2018). Mikroorganisme utama dalam fermentasi tempe kedelai adalah kapang *Rhizopus oligosporus* (Efriwati *et al.*, 2013). Hasil penelitian Samson *et al.* (1987), diketahui bahwa khamir pada tempe komersial di Belanda diantaranya *Trichosporon beigelii*, *Clavispora (Candida) lusitaniae*, *C. maltose*, *C. intermedia*, *Yarrowia lipolytica*, *Lodderomyces elongisporus*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *C. sake*, *Hansenula fabiani*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *Phicia membranaefaciens*, *Rhodotorula rubra*, *C. rugosa*, *C. curvata* dan *Hansenula anomala*.

Fitase sangat penting pada pakan ternak unggas. Fitase dapat diisolasi dari *C. tropicalis* pada tempe kedelai. Aktivitas enzim kasar *C. tropicalis* yang diisolasi dari tempe kedelai pada suhu 60 °C dan pH 4,0 selama inkubasi 15 menit sebesar 6,572 U/mL (Suryani *et al.*, 2018). Akan tetapi, pada tahap aplikasi sebagai imbuhan pakan ternak unggas, aktivitas tersebut perlu ditingkatkan dengan cara dipurifikasi pada suhu dan pH optimum.

Berdasarkan uraian di atas, maka enzim fitase *C. tropicalis* TKD3 perlu dipurifikasi parsial dan dikarakterisasi.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana morfologi *C. tropicalis* TKD3?
2. Bagaimana karakter enzim fitase *C. tropicalis* TKD3 hasil purifikasi parsial?
3. Bagaimana aktivitas enzim fitase, kadar protein terlarut dan aktivitas spesifik enzim fitase *C. tropicalis* TKD3 hasil purifikasi parsial?

1.3 Penegasan Istilah

1.3.1 Purifikasi Parsial

Purifikasi parsial merupakan suatu upaya meningkatkan kemurnian enzim untuk menghasilkan aktivitas spesifik enzim yang lebih tinggi dari ekstrak kasarnya (Poernomo, 2014). Pada penelitian ini, purifikasi enzim yang dimaksud adalah purifikasi parsial enzim fitase dari ekstrak enzim kasar *C. tropicalis* TKD3 untuk menghasilkan aktivitas enzim yang lebih tinggi.

1.3.2 Karakterisasi Enzim

Menurut Masfufatun (2011), karakteristik suatu produk enzim sangat dibutuhkan untuk efisiensi produksi dan untuk memperoleh produk akhir yang berkualitas. Pada penelitian ini, karakterisasi enzim yang dimaksud adalah karakterisasi enzim fitase *C. tropicalis* TKD3 hasil purifikasi parsial yang meliputi pengaruh suhu inkubasi dan pH buffer terhadap aktivitas enzim fitase.

1.3.3 Fitase

Fitase merupakan salah satu enzim yang tergolong dalam kelompok phosphatase, yang mampu menghidrolisis senyawa fitat (*myo-inositol* (1,2,3,4,5,6) *hexakiphosphatase*) menjadi *myo-inositol* dan fosfat organik. Fitase telah banyak diisolasi dari berbagai mikroorganisme seperti khamir (Santoso, 2013). Pada penelitian ini, khamir penghasil enzim fitase adalah *C. tropicalis* TKD3.

1.3.4 *Candida tropicalis*

Menurut Syal (2013), *C. tropicalis* telah dilaporkan menghasilkan fitase- dan dapat ditemukan dalam makanan (Zuza, 2017). Pada penelitian ini, *C. tropicalis* yang dimaksud adalah *C. tropicalis* TKD3 sebagai penghasil enzim fitase yang diisolasi dari makanan fermentasi yaitu tempe kedelai.

1.4 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui morfologi *C. tropicalis* TKD3.
2. Mengetahui karakter enzim fitase *C. tropicalis* TKD3 hasil purifikasi parsial pada variasi suhu inkubasi dan pH buffer.
3. Mengetahui aktivitas enzim fitase, kadar protein terlarut dan aktivitas spesifik enzim fitase *C. tropicalis* TKD3 hasil purifikasi parsial.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah enzim fitase hasil purifikasi parsial dengan aktivitas tertinggi pada suhu dan pH optimum, dapat dijadikan sebagai imbuhan pakan ternak monogastrik (unggas), sehingga ternak monogastrik dapat memanfaatkan fosfor yang terdapat dalam pakan dan mengatasi masalah kurangnya penyerapan nutrisi dalam tubuh ternak monogastrik.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Fitase

Fitase merupakan salah satu enzim yang tergolong dalam kelompok phosphatase yang mampu menghidrolisis senyawa fitat (*myo-inositol* (1,2,3,4,5,6) *hexakiphosphatase*) menjadi *myo-inositol* dan fosfat organik (Lamid *et al.*, 2014). Fitase banyak dimanfaatkan dalam industri pakan ternak. Pakan ternak sebagian besar (80%) berasal dari biji-bijian dan bungkil seperti jagung, kedelai, gandum, bungkil kedelai, bungkil kelapa, bungkil kelapa sawit, sorgum maupu dedak padi. Biji-bijian dan bungkil pakan ternak tersebut selain sebagai sumber karbohidrat, protein dan lemak juga sebagai sumber mineral yang penting bagi pertumbuhan ternak diantaranya yaitu mineral P, Ca, Fe dan Zn. Akan tetapi, biji-bijian dan bungkil tersebut mengandung senyawa anti nutrisi bagi ternak monogastrik yaitu asam fitat (Widjaja *et al.* 2011).

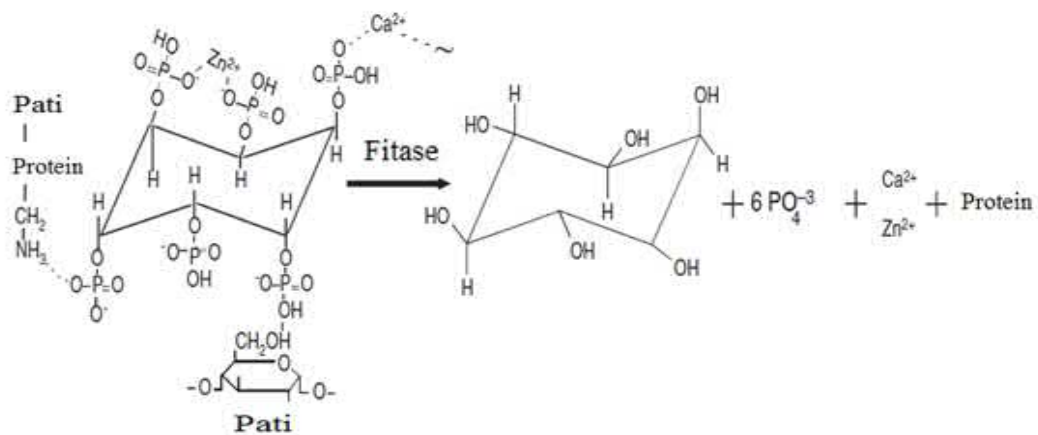
Sekitar 50-80% pakan ternak berada dalam bentuk fitat atau asam fitat. Asam fitat merupakan bentuk penyimpanan fosfor yang terbesar pada tanaman biji-bijian, serelia dan leguminosa yang tidak dapat dihidrolisis dalam saluran pencernaan ternak monogastrik (Thyagarajan *et al.*, 2014; Tungala *et al.*, 2013). Kandungan asam fitat dalam beberapa bahan pakan yang sering digunakan sebagai bahan pakan penyusun ransum unggas adalah sebagai berikut, jagung (0,186%), bungkil kedelai (0,395%), *distiller's dried grains with solubles* (DDGS) (0,257%), tepung limbah roti (0,192%), gandum (0,251%) dan tepung kanola (0,695%). Dedak padi termasuk bahan pakan yang mengandung asam fitat tinggi yaitu mencapai 6,63% (Hidayat *et al.*, 2014).

Ternak monogastrik seperti unggas, tidak mampu mendegradasi senyawa fitat yang mengikat fosfor dan mineral lain seperti Ca, Fe, Zn dan Mg karena tidak adanya enzim fitase pada saluran pencernaannya, sehingga menyebabkan rendahnya ketersediaan unsur fosfor pada pakan ternak monogastrik. Rendahnya kandungan fosfor dan mineral lainnya dalam tubuh ternak monogastrik, membuat

produktivitas ternak monogastrik menurun dan pertumbuhannya juga terhambat. Pada formulasi pakan, umumnya ditambahkan fosfor dalam bentuk fosfat agar ketersediaanya cukup untuk ternak monogastrik (Yanuartono, 2017). Dampak buruk dari anti nutrisi berupa asam fitat ini, dapat dikurangi dengan menambahkan enzim penghidrolisis asam fitat yaitu fitase ke dalam pakan ternak monogastrik. Penambahan enzim fitase ini akan mengurangi aktivitas asam fitat dalam saluran pencernaan ternak monogastrik, sehingga bahan pakan lebih efisien untuk dicerna (Widjaja *et al.* 2011).

Ada dua alasan penambahan fitase pada pakan ternak. Alasan yang pertama adalah untuk mengurangi dampak lingkungan yang berbahaya dari fosfor dari kotoran hewan di daerah dengan produksi ternak intensif. Fitat atau asam fitat pada pupuk kandang terdegradasi oleh mikroorganisme tanah, yang menyebabkan tingginya kadar fosfat bebas di dalam tanah dan akhirnya di permukaan air. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa optimasi asupan fosfor dan pencernaan dengan fitase mampu mengurangi pelepasan fosfor sekitar 30%. Novozymes memperkirakan bahwa jumlah fosfor yang dilepaskan ke dalam lingkungan akan berkurang 2,5 juta ton per tahun diseluruh dunia jika fitase digunakan untuk pakan ternak monogastrik. Penelitian lain juga memperlihatkan bahwa penggunaan fitase pada pakan ternak dapat menggantikan suplemen fosfat anorganik dan mengurangi ekskresi fosfor sebesar 50% (Kim *et al.* 2010).

Alasan kedua didasarkan pada fakta fitat mampu membentuk kompleks dengan protein dan kation anorganik seperti kalsium, magnesium, besi dan seng. Penggunaan fitase tidak hanya melepaskan fosfor terikat tetapi juga nutrisi penting lainnya untuk meningkatkan nilai gizi pakan (Sutrisno, 2017), serta terbukti mampu meningkatkan pertambahan berat tubuh rata-rata perhari hewan ternak (Kusumadjaja, 2009).



Gambar 2.1 Hidrolisis asam fitat oleh fitase (Yao *et al.*, 2011)

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 fosfat organik, ion logam Ca^{2+} , Zn^{2+} dan protein, sehingga fosfat dan mineral yang terikat dilepaskan dan dimanfaatkan oleh tubuh (Gambar 1). Fitase telah banyak diisolasi dari berbagai mikroorganisme seperti khamir (Santoso, 2013). Salah satu khamir penghasil fitase adalah *C. tropicalis*.

2.2 *Candida tropicalis*

Candida tropicalis adalah spesies khamir dalam genus *Candida* (Mastromarino *et al.*, 2013). *Candida tropicalis* termasuk jenis khamir kosmopolit atau dapat hidup diberbagai tempat. Jenis khamir ini banyak ditemukan di alam (Okwulehie, 2010). Berikut ini merupakan klasifikasi *Candida tropicalis* (Puspita, 2010)

Kerajaan : Jamur

Divisi : Ascomycota

Bagian : Saccharomycotina

Kelas : Saccharomycetes

Memesan : Saccharomycetales

Marga : *Candida*

Jenis : *Candida tropicalis*

Ada berbagai media tempat *C. tropicalis* dapat tumbuh secara efektif. Media yang umum digunakan adalah agar Sabouraud yang mengandung pepton dan gula. Media ini cukup untuk mengidentifikasi spesies, akan tetapi dengan kerugian mempermudah pertumbuhan miselia dan menekan pembentukan konidia. Media lain yang umum digunakan adalah agar tepung jagung yang berguna dalam menginduksi pembentukan konidia dan media lainnya yang dapat digunakan untuk pertumbuhan (Puspita, 2010). Suhu optimal untuk pertumbuhan adalah antara 25-35 ° C (77-95 ° F) dan pertumbuhan ditingkatkan jika gula atau lemak ditambahkan dalam medium (Wilson, 2015).

Menurut Widiastutik dan Nur (2014), morfologi makroskopis merupakan morfologi koloni yang meliputi bentuk, warna, elevasi, tepi koloni dan permukaan koloni dengan menggunakan beberapa referensi karakteristik koloni. Sedangkan morfologi mikroskopis yang umumnya diamati untuk identifikasi khamir antara lain bentuk sel, ada tidaknya pertunasan (*budding*), banyaknya tunas pada tiap sel, askospora dan ada tidaknya miselium semu (*pseudomycelium*).

Menurut Syal (2013), *C. tropicalis* telah dilaporkan menghasilkan fitase dan dapat ditemukan dalam makanan (Zuza, 2017). *Candida tropicalis* dihasilkan dari makanan fermentasi tempe kedelai (Lim, 2011).

2.3 Tempe Kedelai sebagai Sumber *Candida tropicalis*

Tempe kedelai adalah produk berbentuk padatan kompak berwarna putih, yang diperoleh dari kedelai kupas yang sudah direbus dan difermentasi (BSN, 2015). Struktur yang kompak disebabkan oleh miselia-miselium jamur yang menghubungkan antara biji-biji kedelai tersebut. Terjadinya degradasi komponen-komponen dalam kedelai juga dapat menyebabkan terbentuknya tekstur yang padat setelah fermentasi (Razie, 2018). Mikroorganisme utama dalam fermentasi tempe kedelai adalah kapang *Rhizopus oligosporus* (Efriwati *et al.*, 2013). Hasil Penelitian Samson *et al.* (1987) diketahui bahwa khamir pada tempe komersial di Belanda diantaranya *Trichosporon beigeli*, *Clavispora (Candida) lusitaniae*, *C. maltose*, *C. intermedia*, *Yarrowia lipolytica*, *Lodderomyces elongisporus*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *C. sake*, *Hansenula fabiani*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *Phicia membranaefaciens*, *Rhodotorula rubra*, *C. rugosa*, *C. curvata* dan *Hansenula anomala*.

Tempe kedelai mengandung mineral makro dan mikro dalam jumlah yang cukup. Jumlah mineral besi, tembaga dan seng. Kapang pada tempe kedelai dapat menghasilkan enzim fitase yang akan menguraikan asam fitat (yang mengikat beberapa mineral) menjadi fosfor dan inositol. Dengan terurainya asam fitat, mineral-mineral tertentu (seperti besi, kalsium, magnesium dan zink) menjadi lebih tersedia untuk dimanfaatkan tubuh (Sine, 2018).

2.4 Purifikasi Parsial

Purifikasi parsial merupakan suatu upaya meningkatkan kemurnian enzim untuk menghasilkan aktivitas spesifik enzim yang lebih tinggi dari ekstrak kasarnya (Poernomo, 2014). Hal ini dapat dibuktikan dari penelitian-penelitian sebelumnya yang telah dilakukan.

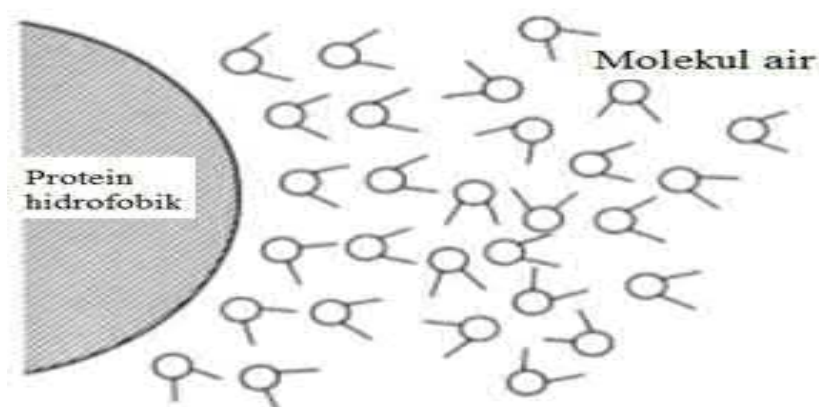
Penelitian tentang purifikasi parsial enzim fitase dari *Hypocrea lixii* SURT01 yang dilakukan oleh Thyagarajan *et al.* (2014) menghasilkan aktivitas spesifik ekstrak kasar enzim sebesar $91 \text{ Uml}^{-1}/\text{mg}^{-1}$ setelah dipresipitasi menggunakan amonium sulfat. Aktivitas spesifik meningkat setelah dilakukan purifikasi menggunakan kromatografi filtrasi gel Sephadex G-150 yaitu sebesar $377,5 \text{ Uml}^{-1}/\text{mg}^{-1}$.

Penelitian yang dilakukan oleh El-Toukhy *et al.* (2013), melaporkan keberhasilannya mengisolasi tiga strain *B. subtilis* dan menapis isolat dengan aktivitas fitase tertinggi dan teridentifikasi sebagai *B. subtilis* MJA. Enzim fitase tersebut dipurifikasi dengan menggunakan kromatografi penukar ion DEAD-Sepharose dan diketahui bahwa aktivitas spesifik enzim fitase meningkat sebesar 2,008 (U/mg) dari ekstrak kasar enzim yaitu 1,075 (U/mg). Setelah dipurifikasi lagi dengan menggunakan Sephacryl S-100 HR aktivitas spesifik enzim meningkat menjadi 4,244 (U/mg).

Sasirekha *et al.* (2012) berhasil mengisolasi 50 isolat dari sampel tanah dan menapis 5 isolat penghasil enzim fitase tertinggi. Satu isolat dengan aktivitas fitase maksimal teridentifikasi secara biokimia sebagai *Pseudomonas* spp. Kondisi kultur dioptimalisasikan untuk produksi enzim maksimum dengan menambahkan sumber karbon dan nitrogen terbaik yaitu 1% glukosa dan 0,5% ekstrak khamir. Hasil menunjukkan bahwa enzim fitase stabil pH 4 sampai 10 dan optimum pada pH 6. Enzim juga stabil pada suhu $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Aktivitas enzim fitase maksimum

adalah 98,76 U/ml setelah 24 jam inkubasi dalam kondisi optimal. Aktivitas spesifik enzim hasil hasil pengendapan menggunakan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dan dialisis lebih tinggi 2,2x (70,77 U/mL/mg) dibandingkan ekstrak kasar (31,86 U/ml/mg protein).

Metode yang umum digunakan untuk purifikasi enzim yaitu dengan prinsip *salting out* menggunakan amonium sulfat. Penambahan amonium sulfat menyebabkan protein mengendap dan aktivitas enzim menjadi meningkat karena menurunnya jumlah kontaminan yang menghalangi sisi aktif enzim untuk berikatan dengan substrat. Penambahan amonium sulfat berpengaruh terhadap protein yang terendapkan selama proses pemurnian. Prinsip *salting out* didasari oleh Ion-ion garam amonium sulfat akan berkompetisi dengan protein untuk menarik molekul air. Ion-ion garam memiliki kelarutan lebih besar dibandingkan dengan protein sehingga ion garam akan menarik molekul air dari protein enzim. Protein-protein enzim akan berinteraksi membentuk gumpalan dan mengendap (Wardani dan Nindita, 2012). Prinsip *salting out*, disajikan pada Gambar 2.2.



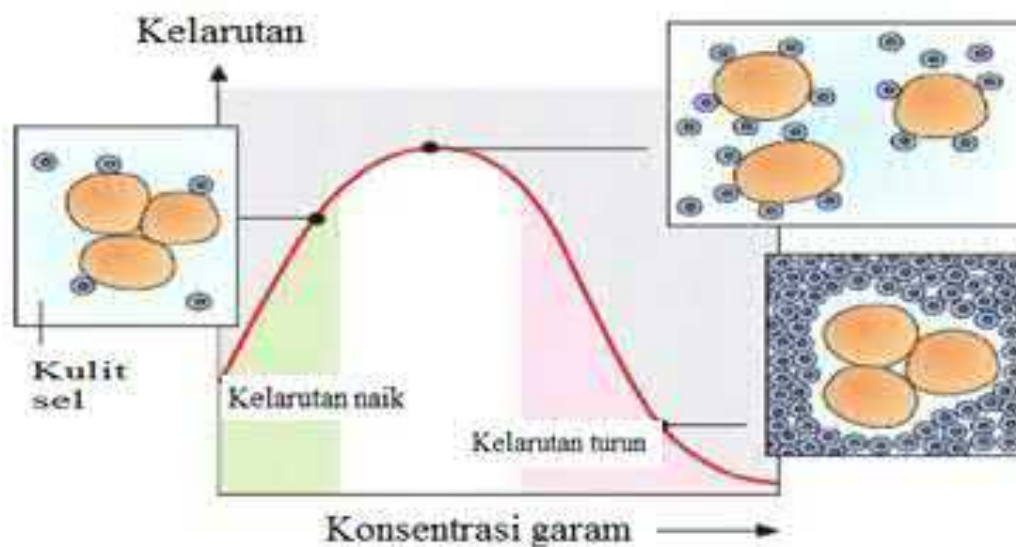
Gambar 2.2 Prinsip *Salting out*, molekul air mengeilingi permukaan hidrofobik dari residu protein (Scopes, 1994).

2.4.1 Presipitasi Enzim Menggunakan Amonium Sulfat

Presipitasi merupakan metode pengendapan dengan aplikasi konsentrasi garam bervariasi dengan penambahan garam amonium sulfat ke dalam ekstrak kasar enzim disertai pengadukan pada suhu rendah (Janson, 2011). Presipitasi menggunakan amonium sulfat merupakan metode yang baik untuk mengendapkan protein dibandingkan dengan proses lainnya seperti ultrafiltrasi

karena protein pada suatu larutan dapat terpisah satu dengan lainnya secara efisien berdasarkan hidrofilisitas dengan cara meningkatkan konsentrasi amonium sulfat secara bertahap (Moore dan Kery, 2009). Garam amonium sulfat sering digunakan dalam proses purifikasi karena sifatnya yang sangat larut, murah, memiliki tingkat purifikasi yang tinggi, rendahnya toksisitas terhadap sebagian besar enzim dan mempunyai efek menstabilkan pada beberapa enzim serta tidak mengubah pH larutan protein sampel menjadi ekstrim, yang dapat mengakibatkan denaturasi protein. Proses ini menggunakan kadar garam tinggi untuk mengendapkan protein, dimana kelarutan protein akan menurun apabila berada pada kondisi tersebut (Noviyanti *et al.*, 2012).

Semakin tinggi konsentrasi garam tersebut, kelarutan protein akan semakin rendah sehingga protein akan mengendap. Penambahan garam secara terus menerus secara perlahan akan menaikkan konsentrasi garam dalam larutan. Garam memiliki derajat ionisasi yang lebih tinggi daripada protein, sehingga garam memiliki afinitas yang lebih tinggi terhadap air yang mengelilingi protein. Akibatnya, terjadi kompetisi antara garam dan protein untuk mempertahankan molekul air. Namun, semakin tinggi konsentrasi garam, kepolaran protein tidak mampu menyaingi kepolaran garam sehingga molekul air akan lebih tertarik pada garam. Akibatnya, molekul air tidak lagi melindungi protein dan asam amino hidrofobik akan semakin muncul ke permukaan (Gambar 2.3).



Gambar 2.3 Pengaruh Kadar Garam terhadap Kelarutan Protein (Culter, 2004)

2.5 Karakterisasi Enzim

Enzim merupakan biokatalisator yang tersusun atas bagian protein, oleh karena itu sistem kerja enzim sangat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan seperti suhu dan pH. Penentuan kondisi optimum kerja enzim penting untuk dilakukan agar reaksi enzimatik dapat berjalan dengan optimal. Suhu dan pH akan mempengaruhi konformasi protein enzim dan berpengaruh terhadap kemungkinan pengikatan substrat oleh enzim (Alam *et al.*, 2013). Masfufatun (2011) menjelaskan bahwa pengungkapan karakteristik suatu produk enzim sangat dibutuhkan untuk efisiensi proses produksi dan untuk memperoleh produk akhir yang berkualitas. Oleh sebab itu, karakterisasi enzim dilakukan untuk mengetahui pengaruh suhu dan pH terhadap aktivitas enzim.

2.5.1 Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Enzim

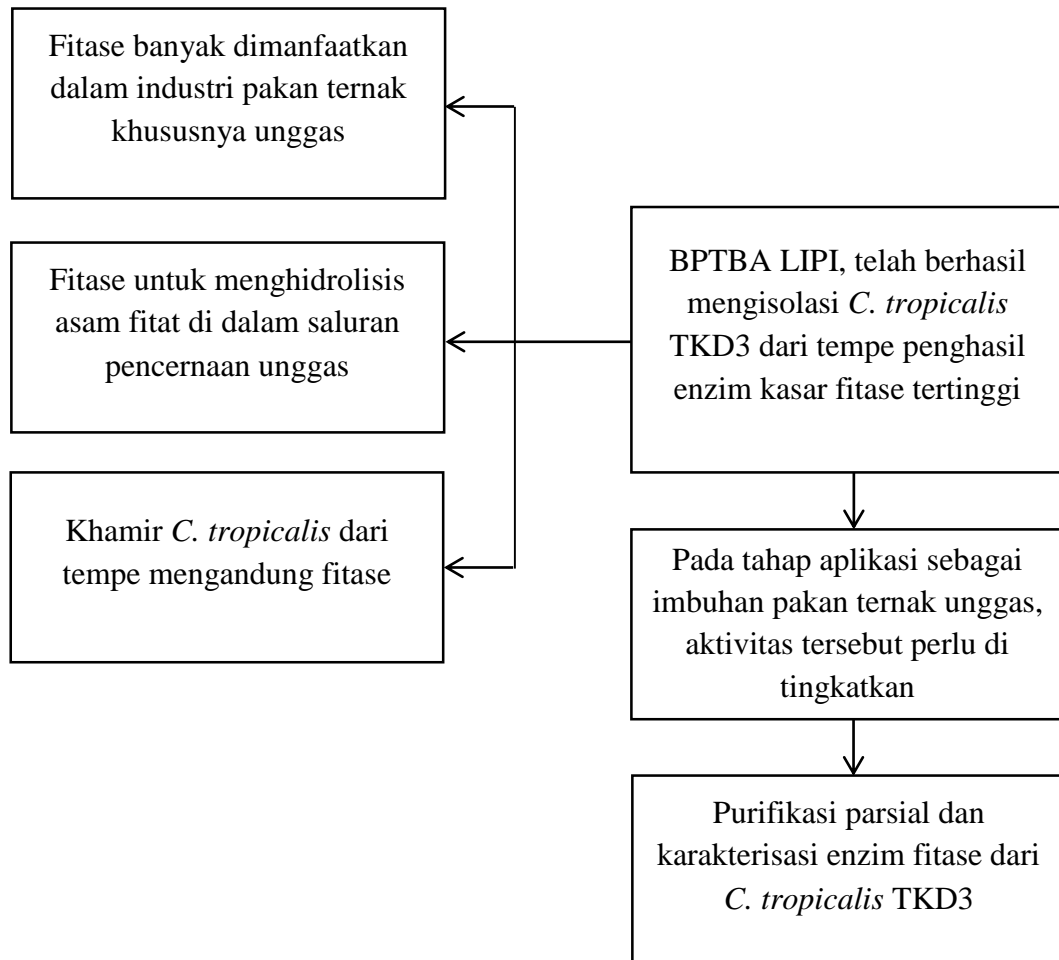
Suhu memainkan peranan yang sangat penting dalam reaksi enzimatik. Ketika suhu bertambah sampai suhu optimum, kecepatan reaksi enzim naik karena energi kinetik bertambah. Bertambahnya energi kinetik akan mempercepat gerak baik enzim maupun substrat. Hal ini akan memperbesar peluang enzim dan substrat bereaksi. Ketika suhu lebih tinggi dari suhu optimum, protein berubah konformasi sehingga gugus reaktif terhambat, menyebabkan enzim terdenaturasi. Suhu yang tidak sesuai substrat dapat berubah konformasinya, sehingga substrat tidak dapat masuk ke dalam sisi aktif enzim (Rumiris *et al.* 2012).

2.5.2 Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Enzim

Enzim memiliki pH optimum yang khas, yaitu pH yang dapat menghasilkan aktivitas maksimum dalam mengkatalisis suatu reaksi. Perubahan pH berpengaruh terhadap aktivitas enzim melalui perubahan struktur atau muatan residu asam amino yang berfungsi dalam pengikatan substrat. pH yang bervariasi juga dapat menyebabkan perubahan konformasi enzim. Hal ini terjadi karena gugus bermuatan yakni $-NH_3^+$ atau $-COO^-$ yang jauh dari daerah terikatnya substrat yang mungkin diperlukan untuk mempertahankan struktur tersier yang akan mengalami perubahan muatan pada pH yang berbeda. Hal ini menyebabkan terganggunya ikatan ionik dan terputusnya ikatan enzim dengan substrat (*foldng*) sehingga konformasi enzim berubah. Perubahan inilah yang menyebabkan aktivitas enzim menurun (Hamzah, 2018)

2.6 Kerangka Berpikir

Kerangka berpikir penelitian ini disajikan pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Kerangka berpikir

2.7 Hipotesis

1. Morfologi koloni dan sel *C. tropicalis* TKD3 dengan media *Chloramphenicol Yeast Glucose (CYG) agar*.
2. Enzim fitase *C. tropicalis* TKD3 hasil purifikasi parsial dapat menggambarkan karakter optimum aktivitas enzim fitase yang lebih baik.
3. Enzim fitase, kadar protein terlarut dan aktivitas spesifik enzim fitase *C. tropicalis* TKD3 hasil purifikasi parsial dapat menghasilkan peningkatan aktivitas.

BAB 5

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan, disimpulkan bahwa:

1. Bentuk koloni *Candida tropicalis* TKD3 sirkuler, warna putih susu, elevasi convex, tepian entire, permukaan *smooth* dan mengkilat. Bentuk sel basilus dan bertunas.
2. Aktivitas enzim fitase hasil purifikasi parsial *C. tropicalis* TKD3 dalam sediaan cair optimum pada suhu inkubasi 55 °C dan pH buffer 4.
3. Aktivitas enzim fitase dan kadar protein terlarut enzim fitase hasil purifikasi parsial lebih tinggi secara signifikan daripada enzim kasarnya, akan tetapi aktivitas spesifik enzim fitase hasil purifikasi parsial sama secara signifikan dengan enzim kasarnya.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini diperoleh enzim hasil purifikasi parsial dalam sediaan cair. Agar supaya enzim tersebut dapat diaplikasikan secara efisien sebagai campuran pakan ternak unggas dan untuk mempertahankan stabilitas enzim selama proses penyimpanan, maka disarankan untuk dilakukan preparasi enzim menjadi serbuk kering melalui metode kering beku (*freeze drying*).

DAFTAR PUSTAKA

- Ajith, S., J. Ghosh, D. Shet, Shreevidhya, B.D. Punith, & A.V. Elangovan. 2019. Partial Purification and Characterization of Phytase from *Aspergillus foeditus* MTCC 11682. *AMB Express*, 9(3): 1-11.
- Alam, M.S., P.R. Sarjono, & A.L.N. Aminin. 2013. Isolasi dan Karakterisasi Selulase dari Bakteri Selulolitik Termofilik Kompos Pertanian Desa Bayat, Klaten, Jawa Tengah. *Jurnal Sains dan Matematika*, 21(2): 48-53.
- Amin, F., H.N. Bhatti, & M. Asgher. 2010. Partial Purification and Characterization of an Acid Invertase from *Saccharum officinarum* L. *Pakistan Journal of Botany*, 42(4): 2531-2540.
- Badan Standardisasi Nasional. 2015. *Tempe Kedelai*. Jakarta: Badan Standardisasi Nasional.
- Bedford, M.R. & G.G. Partridge. 2010. *Enzyme in Form Animal Nutrition 2nd Edition*. London : CAB International.
- Bhavsar, K.P., V.R. Kumar, & J. Khire. 2012. Downstream Processing of Extracellular Phytase from *Aspergillus niger*: Chromatography Process vs. Aqueous Two Phase Extraction for its Simultaneous Partitioning and Purification. *Process Biochemistry*, 47: 1066–1072.
- Cutler, P. 2004. *Protein Purification Protocols Second Edition*. New Jersey: Humana Press.
- Das, P. & K. Ghosh. 2014. Evaluation of Phytase Production by *Candida tropicalis* Isolated from Gut Fish and Subsequent Bio-Processing of Groundnut Oil Cake Under Solid State Fermentation. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 3(6): 470-476.
- Demir, Y., M.S. Kotan, N. Dikbas, & S. Beydemir. 2017. Phytase from *Weissella halotolerans*: Purification, Partial Characterisation and the Effect of Some metals. *International Journal of Food Properties*, 20(S2): S2127-S2137.
- Efriwati, A. Suwanto, G. Rahayu, & L. Nuraida. 2013. Population Dynamics of Yeast and Lactic Acid Bacteria (LAB) during Tempe Production. *Hayati Journal of Biosciences*, 20(2): 57-64.
- El-Thouky, N.M.K., A.S. Youssef, & M.G.M. Mikhail. 2013. Isolation, Purification, and Characterization of Phytase from *Bacillus subtilis* MJA. *African Journal of Biotechnology*, 12(20): 2598-2967.

- Fitria, F., S. Pujiyanto, B. Raharjo, N. Rahmani, & Y. Yopi. 2017. Pemurnian Parsial dan Karakterisasi Enzim Xilinase dari Bakteri Laut *Bacillus safiencis* strain LBF P20 Asal Pulau Pari Jakarta. *Agritech*, 37(1): 30-37.
- Hamzah, H. 2018. Isolasi dan Karakterisasi Enzim Selulase dari Keong Sawah *Pila ampullacea* Menggunakan Substrat Serbuk Gergaji Kayu. *Jurnal Farmasi, Sains, dan Kesehatan*, 4(1): 16-21.
- Hasan, A.A. & H.A. Al-Jobory. 2016. Purification and Characterization of Phytase from Fruit Bodies of Local Mushroom *Pleurotus ostreatus* Grown by *Solid State Fermentation*. *Tikrit Journal of Pure Science*, 21(1): 1-10.
- Hidayat, C. Sumiati, & S. Iskandar. 2014. Respon pertumbuhan ayam lokal Sentul G-3 terhadap ransum berkadar dedak tinggi yang diberi suplementasi enzim fitase dan ZnO. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*. 19:193-202.
- Istiqomah, L. 2015. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Fitase dari Saluran Pencernaan Unggas serta Karakterisasi Fitasenya. Tesis. Sekolah Pascasarjana. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Janson, J.C. 2011. *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Application*. New York: John and Wiley Inc.
- Jindamorakot, S., S. Ninomiya, S. Limtong, & W. Yongmanitchai. 2009. Three newspecies of bipolar budding yeast of the genus *Hanseniaspora* and its anamorph *Kloeckera* isolated in Thailand. *FEMS Yeast Research*. 9(8): 1327-1337.
- Jumiyati, S.H. Bintari, & I. Mubarak. 2012. Isolasi dan identifikasi khamir secara morfologi di tanah kebun wisata pendidikan Universitas Negeri Semarang. *Biosaintifika*, 4(1): 27-35.
- Kim, O.H., Y.O. Kim, J.H. Shim, Y. Jung, W.J. Jung, W.C. Choi, H. Lee, S.J. Lee, J.H. Auh, & K.K. Kim. 2010. β -Propeller Phytase Hydrolyzes Insoluble Ca^{2+} -Phytate Salts and Completely Abrogates the Ability of Phytate to Chelate Metal Ions. *Journal Biochemistry*, 49: 10216–10217.
- Koffil, D.M., J.T. Gonnetty, B.M. Faulet, M.E. Bedikou, L.P. Kouame, I.A.Z. Bi, & S.L. Niamke. 2010. Biochemical Characterization of Two Non-Specific Acid Phosphatases from Cucurbitaceae (*Lagenaria siceraria*) Edible Seeds Exhibiting Phytasic Activity. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 3: 860-875.
- Krieg, N.R., J.T. Staley, D.R. Brown, B.P. Hedlund, B.J. Paster, N.L. Ward, W. Ludwig, & W.B. Whitman. 2010. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, USA: Springer.

- Kumar, R.P., T. Naik, A. Shaik, S. Dastager, K.V. Ravi, J. Khire, & Mahesh D. 2018. Evaluation of *Candida tropicalis* NCIM 3321 Extracellular Phytase Having Plant Growth Promoting Potential and Process Development. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. (13) 225-235.
- Kurtzman, C.P. & C.J. Robnett. 1998. Identification and phylogeny of *ascomycetous* yeasts from analysis of nuclear large subunit (26s) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*. 73(4): 331–371.
- Kurtzman, C.P. & J.W. Fell. 2012 –The Yeasts: A Taxonomic Study. 5th ed. Elsevier Science Publishers. Amsterdam (NL).
- Kusumadjaja, A.P., T. Budiati, N.T.T. Puspaningsih, & Sajidan. 2009. Screening Mikroorganisme Termofilik Penghasil Enzim Fitase yang Tumbuh di Kawah Ijen Banyuwangi. *Indonesian Journal of Chemistry*, 9 (3): 500-504.
- Lamid, M., N.T.T. Puspaningsih, & O. Asmarani. 2014. Potensi Enzim Fitase Asal Bakteri Rumen terhadap Analisis SEM Perubahan Struktur Dedak Padi sebagai Pakan Ayam Pedaging. *Jurnal Veterinaria Medika*, 7(1): 17-22.
- Li, X., Z. Chi, Z. Lio, J. Li, X. Wang, & N.Y. Hirimuthugoda. 2008. Purification and Characterization of Extracellular Phytase from a Marine Yeast *Kodamaeae ohmeri* BG3. *Marine Biotechnology*, 10: 190-197.
- Lim, S.L. & S.T. Tay. 2011. Diversity and killer activity of yeasts in Malaysian fermented food samples. *Tropical Biomedicine*, 28(2): 438-443.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, & R.J. Randall. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal Biology of Chemistry*, 193: 265-275.
- Mandviwala, T.N. & J.M. Khire. 2000. Production of High Activity Thermostable Phytase from Thermotolerant *Aspergillus niger* in Solid State Fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 24: 237-243.
- Masfufatun. 2011. Isolasi dan Karakterisasi Enzim Selulase. *Jurnal*. Surabaya: Universitas Wijaya Kusuma Surabaya.
- Mastromarino, P., B. Vitali, & L. Mosca. 2013. Bacterial vaginosis: ulasan tentang uji klinis dengan probiotik. *Mikrobiologi Baru*, 36(3): 229–238.
- Mopera, E., M. Ohtani, S. Sekighuci, T. Sone, A. Abe, M. Tanaka, V. Meevootisom, & K. Asano. 2012. Purification and Characterization of

- Phytase from *Klebsiella pneumonia* 9-3B. *Journal Scinces*,113(5): 562-567.
- Moore, P.A. & V. Kery. 2009. High-throughput Protein Concentration and Buffer Exchange: Comparison of Ultrafiltration and Ammonium Sulphate Precipitation. *Methods in Molecular Biology*, 498: 309-314.
- Murni, S.W., S.D. Kholisoh, D.L. Tanti, & E.M. Petrissia. 2015. Produksi, Karakterisasi, dan Isolasi Lipase dari *Aspergillus niger* menggunakan Minyak Goreng Sawit sebagai Induser. *Eksergi*, 12(1): 01-04.
- Nakamura, Y., H. Fukuhara, & K. Sano. 2000. Secreted Phytase Activities of Yeasts. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64(4): 841-844.
- Naves, L.D.P., A.D. Correa, A.G. Bertechini, E.M. Gomide, & D.C.D. Santos. 2012. Effect of pH and Temperatur Used in Broiler Nutrition. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 14(3): 181-185.
- Noviyanti, T., P. Ardiningsih, & W. Rahmalia. 2012. Pengaruh Temperatur terhadap Aktivitas Enzim Protease dari Daun Sansakng (*Pycnarrhena cauliflora* Diels). *Jurnal Kimia Khatulistiwa*, 1 (1): 31-34.
- Octarya, Z., S. Syukur, & E. Purwati. 2013. 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(2): 106-114.
- Okwulehie, I. Cyriacus, & A.N. Kingsley. 2010. Fungi Associated with Deterioration of Sour-Sop (*Anona muricata*. Linn) Fruits in Abia State, Nigeria. *African Journal of Microbiology Reaserch*, 4(3): 143-146.
- Olstorpe, M., R.J. Schnu, & V. Passoth. 2009. Screening of Yeast Strains for Phytase Activity. *FEMS Yeast Res* 478-488.
- Packeiser, H., C. Lim, B. Balagurunathan, J. Wu, & H. Zhao. 2013. An extremely simple and effective colony PCR procedure for bacteria, yeasts, and microalgae. *Appl Biochem Biotech.* 169:695–700.
- Pandey, A., G. Szakacs, C.R. Soccol, L.J.A. Rodriguez, & T.V. Soccol. 2001. Production, Purification and Properties of Microbial Phytases. *Journal Bioresource Technology*, 77(3): 203-214
- Poernomo, A.T., Sudjarwo, & A. Parasati. 2014. Purifikasi Parsial Enzim Fibrinolitik Tempe Kacang Koro (*Canavalia ensiformis*) Produk Fermentasi *Rhizopus oryzae* FNCC 6078. *Jurnal Kimia Farmasi*, 3(2): 23-30.

- Prihantini, N.N., T. Khusniati, M. Bintang, A. Choliq, & Sulistiani. 2013. Purifikasi Parsial dan Karakterisasi β -Galactosidase dari *Lactobacillus plantarum* Strain D-210. *Jurnal Kedokteran Yarsi*, 21(1): 014-026.
- Puspita, J.P. 2010. *Optimasi Konsentrasi Xilosa dan Glukosa Untuk Produksi Xilitol oleh Candida tropicalis*. Bogor. Departemen Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor.
- Razie, F. & Widiawati, L. 2018. Kombinasi Pengemasan Vakum dan Ketebalan Kemasan untuk Memperpanjang Umur Simpan Tempe. *Jurnal Agritepa*, 4(2): 94-107.
- Roto, S.M., P.M. Rubinelli, & S.C. Ricke. 2015. An introduction to the avian gut microbiota and the effects of yeast based prebiotic-type compounds as potential feed additives. *Frontiers in Veterinary Science*. 2: 28.
- Rumiris, M., S. Devi, & A. Dahliaty. 2012. Optimalisasi Suhu Produksi Enzim Selulase dari Bakteri Selulolitik yang diisolasi Dari Sungai Siak. *Jurnal Kimia*, 7(1) : 1-7.
- Salimia, R., M. Hashemi, M. Safari, & M. Mousivand. 2016. A Novel Phytases Characterized by Thermostability and High PH tolerance From Rice Phyllosphere Isolated Bacillus subtilis B. S.46. *Journal of Advanced Research*, 7(3): 381-390.
- Samson, R.A., K.J.A. Van, & B.E. De. 1987. Microbial Quality Of Commercial Tempe In The Netherlands. *Journal of Food Protection*, 50(2): 92-94.
- Santoso, S. & Sajidan. 2013. Keberadaan Bakteri Penghasil Fitase untuk Perbaikan Kesuburan Tanah Vertisol Pada Berbagai Sistem Budidaya Tanam di Berbagai Kecamatan Gondangrejo Kabupaten Karanganyar. *Bioedukasi*, 6(1): 1-11.
- Sari, R.A., R.A. Nofiani, & P. Ardiningsih. 2010. Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Genus Leuconostoc dari Pekasam Ale-Ale Hasil Formulasi Skala Laboratorium. *Jurnal Kimia Khatulistiwa*. 1(1): 14-20.
- Sari, M.L. & F.G.N. Ginting. 2012. Pengaruh Penambahan Enzim Fitase Pada Ransum terhadap Berat Relatif Organ Pencernaan Ayam Broiler. *Jurnal Agripet*, 12(2): 37-41.
- Saropah, D.A., A. Jannah, & A. Maunatin. 2012. Kinetika Reaksi Enzimatis Ekstrak Kasar Enzim Bakteri Selulolitik Hasil Isolasi dari Bekatul. *Jurnal Alchemy*, 2(1): 34-45.

- Sasirekha, B., T. Bedashree, & K.L. Champa. 2012. Optimization and Partial Purification of Extracellular Phytase from *Pseudomonas aeruginosa* p6. *European Journal of Experimental Biology*, 2: 95-104.
- Seftiono, H. 2017. Penentuan Aktifitas Enzim Mananase dari Berbagai Mikroorganisme di Indonesia dan Peranannya dalam Bidang Pangan: Kajian Pustaka. *Agrointek*, 11(1): 14-19.
- Sethi, S. & Gupta, S. 2014. Optimization Cultural Parameters for Cellulase Enzyme Production from Fungi. *Journal of Biology and Life Sciences*, 2(3): 989-996.
- Scopes, R.K. 1994. *Protein Purification Principle and Practice Third Edition*. New York: Springer Science+Business Media.
- Sine, Y. & Soetarto, E.S. 2018. Perubahan Kadar Vitamin dan Mineral pada Fermentasi Tempe Gude (*Cajanus cajan* L.). *Jurnal Saintek Lahan Kering*, 1(1): 1-3.
- Suryani, A.E., A. Sofyan, H. Julendra, H. Herdian, E. Damayanti, L. Istiqomah, M.F. Karimy, A.A. Sakti, A.S. Anggraeni, & M. Anwar. 2018. Pengembangan Produk Konsorsium Mikroba Fungsional untuk Peningkatan Performa Ternak. Laporan Teknis BPTBA LIPI. hal. 1-58.
- Sutrisno, A. 2017. *Teknologi enzim*. Malang: UB Press.
- Suyal, D.C. & L. Tewari. 2013. In Vitro Degradation of Natural Animal Feed Substrates by Intracellular Phytase Producing Shiwalik Himalayan Budding Yeasts. *African Journal of Microbiology Research*, 7(47): 5374-5383.
- Tarigan, W.F., Sumardi, & W.A. Setiawan. 2015. Karakterisasi Enzim Selulase dari Bakteri Selulolitik Bacillus sp. Seminar Nasional Sains dan Teknologi VI.
- Tariq, M., M. Nawaz, A.A. Anjum, S. Sana, M.A. Hafeez, J. Nazir, W. Shahzad, & M.I. Najeeb. 2017. Production and Characterization of Phytase from Indigenous *Aspergillus niger* Isolates. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 54(4): 799-806.
- Thyagarajan, R., K.R. Namasivayam, & G. Narendrakumar. 2014. Partial Purification of Phytase from *Hypocrea Lixii* Surt01, A Poultry Isolate. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 5(4): 1-8.
- Tu, S., L. Ma, & B. Rathinasabapathi. 2011. Characterization of Phytase from Three Ferns with Differing Arsenic Tolerances. *Journal Plant Physiology and Biochemistry*, 49: 146-150.

- Tungala, A., K.A. Narayan, & M.S. Muthuraman. 2013. Isolation of Phytase Produce Bacteria from Poultry Faeces and Optimization of Culture Condition Forenhanced Phytase Production. *Internation Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, (5)4: 264-269.
- Vohra, A. & T. Satyanarayana. 2001. Phytase Production by the Yeast, *Pichia anomala*. *Biotechnology Letters*, 23: 551-554.
- Wardani, A.K. & L.O. Nindita. 2012. Purifikasi dan Karakterisasi Protease dari Bakteri Hasil Isolasi dari Whey Tahu. *Jurnal Teknologi Pertanian*, 13(3): 149-156.
- Weaver, J.D., A.H.J. Ullah, K. Sethumdhavan, E.J. Mullaney, & X.G. Lei. 2009. Impact of Assay Conditions on Activity Estimate Comparison of *Aspergillus niger* PhyA and *Esherichia coli* AppA2 phytases. *J. Agric. Food Chem.* 57(12): 5315-5320.
- Widiastutik, N. & H.A. Nur. 2014. Isolasi dan Identifikasi Yeast dari Rhizosfer *Rhizophora mucronata* Wonorejo. *Jurnal Sains dan Seni Pomits*, 3(1): 2337-3520.
- Widjaja, E., T. Toharmat, D.A. Santoso, Sumiati, M. Ridla, & S. Iskandar. 2011. Potensi Nira Tebu sebagai Suplemen Cair dan Karier Enzim Fitase untuk Unggas secara In Vitro. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*. 16(4): 272-279.
- Wilson, C.B., V. Nizet, Y. Maldonado, J.S. Remington, & J.O. Klein. 2015. *Penyakit Infeksi Remington dan Klein pada Janin dan Bayi Baru Lahir*. Philadelphia, AS: Saunders.
- Wuczkowski, M., Y. Gerbawy, G.F. Kraus, C.P. Kubicek, K. Sterflinger, & H. Prillinger. 2007. Identification of Filamentous Fungi and Yeast and Their Diversity in Soil of The Alluvial Zone National Park Along The River Danube Downstream of Vienna, Austria. 12, 13, ACBR. Austria.
- Yanuartono, A. Nurrozi, & S. Indrajulianto. 2017. Fitat dan Fitase: Dampak pada Hewan Ternak. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*, 26(3): 59-78.
- Yao, M.Z., Y.H. Zhang, W.L. Lu, M.Q. Hu, W. Wang, & A.H. Liang. 2011. Phytases: Crystal Structures, Protein Engineering and Potential Biotechnological Aplications, *J. Applied Microbiol*, 112(1): 1-14.
- Zuza, A.D.L., S.W.P. Rocha, & G.M. Chaves. 2017. Pembaruan tentang *Candida tropicalis* berdasarkan pada pendekatan dasar dan klinis. *Perbatasan dalam Mikrobiologi*, 8 :1927.