

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI KHAMIR  
POTENSIAL PENGHASIL FITASE DARI BIJI JAGUNG (*Zea mays* L.)**

**SKRIPSI**

**Oleh:  
AYU INTAN SAFITRI  
NIM. 15620065**



**PROGRAM STUDI BIOLOGI  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2022**

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI KHAMIR  
POTENSIAL PENGHASIL FITASE DARI BIJI JAGUNG (*Zea mays* L.)**

**SKRIPSI**

**Oleh:  
AYU INTAN SAFITRI  
NIM. 15620065**

**Diajukan Kepada :  
Fakultas Sains dan Teknologi  
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang  
untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam  
Memperoleh Gelar Sarjana (S.Si)**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2022**

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI KHAMIR POTENSIAL  
PENGHASIL FITASE DARI BIJI JAGUNG (*Zea mays* L.)**

**SKRIPSI**

**Oleh :  
AYU INTAN SAFITRI  
NIM. 15620065**

**Telah diperiksa dan disetujui untuk diuji  
Tanggal : 17 Juni 2022**

**Pembimbing I**



**Ir. Liliek Harianie AR., M. P  
NIP. 19620901199803 2 001**

**Pembimbing II**



**Dr. Ahmad Barizi, M.A  
NIP. 19731212199803 1 008**

**Mengetahui,  
Kefua Program Studi Biologi**



**Dr. Evika Sandi Savitri, M. P  
NIP. 19741018200312 2 002**

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI KHAMIR POTENSIAL  
PENGHASIL FITASE DARI BIJI JAGUNG (*Zea mays* L.)**

**SKRIPSI**

Oleh:

**AYU INTAN SAFITRI**

**NIM. 15620065**

**Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi dan  
Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan untuk  
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

**Tanggal: 17 Juni 2022**

<b>Penguji Utama</b>	<b>Prof. Dr. Hj. Ulfah Utami, M.Si</b> NIP.19650509 199903 2 002	
<b>Ketua Penguji</b>	<b>Prilya Dewi Fitriyani, M.Sc</b> NIDT. 19900428 20160801 2062	
<b>Sekretaris Penguji</b>	<b>Ir. Liliek Harianie, AR, M.P</b> NIP. 19620901 199803 2 001	
<b>Anggota Penguji</b>	<b>Dr. H. Ahmad Barizi, M.A</b> NIP.1973121 199803 1 008	

**Mengesahkan,**  
**Ketua Program Studi Biologi**



**Dr. Evika Sandi Savitri, M.P**  
NIP. 19741018 200312 2 002



## LEMBAR PERSEMBAHAN

Syukur Alhamdulillah, tiada kata terindah selain syukur kepada Allah SWT yang telah memberikan Rahmat dan Hidayah-Nya, sehingga saya diberikan kesempatan untuk belajar sebagian ilmu-Nya ini. Sholawat serta salam tetap terlimpah curahkan kepada junjungan kita Nabi besar Muhammad SAW. Semoga dengan selesainya tugas akhir ini menjadi baju pijakan dalam meraih tujuan baik dan cita-cita kedepannya.

Kupersembahkan karya yang jauh dari kata sempurna kepada orang-orang hebat yang telah memberikan motivasi dan dukungannya, khususnya kepada:

1. Kedua orang tua saya, Bapak Syafa'un dan Ibu Susilawati yang tiada hentinya memberikan dukungan, motivasi semangat, nasihat, serta do'a yang selalu dihadiahkan untukku disetiap sujud beliau
2. Kedua kakak saya Zainal azhar, Sendika ady putra, dan adik saya Walimatus sya'diyah
3. Teman-teman seperjuangan penelitian di Laboratorium Mikrobiologi
4. Teman-teman Biologi 15, khususnya kelas C.
5. Terimakasih sebanyak-banyaknya pula kepada Nuna, Retno, Indah, Mutia, Arifatul, teman dan kawan-kawan lainnya yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu.
6. Terimakasih kepada imam ku yang selalu ada dalam mengerjakan skripsi ini mas rifqi hubaib semoga yang kita panjatkan selalu bersama ridho allah

Karena dukungan motivasi, canda tawa, nasihatnya semoga Allah membalas semua kebaikan yang telah diberikan. Semoga Allah selalu melimpahkan Rahmat dan Hidayah-Nya kepada kita semua. *Aamiin Ya Robbal Alamin.*

## MOTTO

إِنَّ مَعَ الْعُسْرِ يُسْرًا

*“Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan”*

(QS. Al-Insyirah/94: 6)

~Semua yang kamu lakukan itu bernilai, baik buruknya tergantung kamu. Tapi  
jika kamu merasa itu tidak bernilai, maka cari nilainya agar hidupmu lebih  
bermakna~

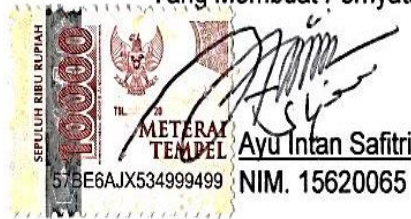
## HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ayu Intan Safitri  
NIM : 15620065  
Fakultas/Jurusan : Sains dan Teknologi/Biologi  
Judul Penelitian : Isolasi dan Karakterisasi Khamir Potensial  
Penghasil Fitase dari Biji Jagung (*Zea  
Mays L.*)

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya sendiri, bukan merupakan pengambil alihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 20 Juni 2022  
Yang Membuat Pernyataan



## **HALAMAN PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI**

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

## **Isolasi dan Karakterisasi Khamir Potensial Penghasil Fitase dari Biji Jagung (*Zea mays* L.)**

Ayu Intan Safitri, Liliek Harianie, Ahmad Barizi

### **ABSTRAK**

Khamir merupakan mikroorganisme uniseluler eukariotik yang memiliki banyak manfaat, salah satunya yakni kemampuannya dalam produksi enzim fitase. Fitase berperan penting dalam degradasi senyawa anti-nutrisi yakni asam fitat pada biji-bijian. Asam fitat mampu mengikat fosfor dan nutrisi dalam biji sehingga menghambat penyerapan nutrisi pada sistem pencernaan hewan, khususnya monogastrik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jenis khamir asal biji jagung (*Zea mays* L.) yang berpotensi menghasilkan enzim fitase hingga tingkat kelas. Langkah awal yakni dilakukan isolasi khamir dari biji jagung, kemudian dilanjut dengan proses purifikasi sehingga didapat lima isolat khamir dan diberi kode YFJ-1, YFJ-2, YFJ-3, YFJ-4, dan YFJ-5. Langkah selanjutnya yakni uji enzim fitase dengan skrining menggunakan media agar selektif fitase (PSMA) dan didapatkan tiga isolat dengan zona hidrolitik tertinggi yang nantinya digunakan sebagai uji lanjutan, diantaranya isolat YFJ-4, YFJ-3, dan YFJ-1 dengan masing-masing indeks hidrolitik sebesar 3,69 mm; 3,36 mm dan 3,26 mm. Uji aktivitas fitase dilakukan menggunakan instrumen spektrofotometri  $\lambda$ 700 nm dan memperhitungkan hasil aktivitas enzim berdasarkan kurva standar larutan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  konsentrasi 0, 10, 20, 30, 45, dan 50 ppm. Berdasarkan uji aktivitas fitase, isolat YFJ-4 memiliki aktivitas fitase tertinggi yakni sebesar  $0,144 \text{ U/mL} \pm 9,501 \text{ U/mL}$ , isolat YFJ-3 sebesar  $0,117 \text{ U/mL} \pm 6,831 \text{ U/mL}$  dan YFJ-1 sebesar  $0,093 \text{ U/mL} \pm 3,873 \text{ U/mL}$ . Khamir penghasil fitase kemudian diidentifikasi berdasarkan karakteristik morfologi makroskopik, mikroskopik, serta uji biokimia fermentasi karbohidrat dan uji fosfat fosfomolibdat. Hasil pengamatan menunjukkan bahwasannya isolat khamir YFJ-1, YFJ-3, dan YFJ-4 dapat diklasifikasikan kedalam kelas *Ascomycetes*.

Kata kunci: *asam fitat, biji jagung, fitase, fosfat, khamir*

**Isolation and Characterization Yeast Potential Producer Phytase from Corn Seed  
(*Zea mays* L.)**

Ayu Intan Safitri, Liliek Harianie, Ahmad Barizi

**ABSTRACT**

Yeast is a microorganism of unicellular eukaryotes that has many benefits, one of them can produce the phytase. Phytase plays a role important in the degradation of an anti-nutritional compound in grains, that is phytic acid. Phytic acid is capable tie phosphorus and nutrition in the seed so which hinders absorption of nutrition in the system digestion of animals, especially monogastric. The purpose of this study was to know the type of yeast origin corn seed (*Zea mays* L.) which has the potential to produce phytase until the level class of yeast classification. The first step is to conduct isolates yeast from corn seed, then continued with the purification and got five isolates yeast and given code YFJ-1, YFJ-2, YFJ-3, YFJ-4, and YFJ-5. The next step is phytase assay with screening phytase using selective phytase medium (PSMA) and obtained three isolates with the highest hydrolytic activity are YFJ-4, YFJ-3, and YFJ-1 with each index hydrolytic by 3,69 mm; 3,36 mm dan 3,26 mm. Phytase activity assessed conducted using spectrophotometry  $\lambda 700$  nm and takes into account the results of activity enzyme based on curve standard  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  solution concentrations of 0, 10, 20, 30, 45, and 50 ppm. Based on the activity essay, isolate code YFJ-4 has the highest phytase activity that is of  $0.144 \text{ U/mL} \pm 9.501 \text{ U/mL}$ , isolate YFJ-3 has  $0.117 \text{ U/mL} \pm 6.831 \text{ U/mL}$ , and YFJ-1 has  $0.093 \text{ U/mL} \pm 3.873 \text{ U/mL}$ . Yeast producer phytase is identified based on characteristics morphology of macroscopic, microscopic, and biochemical tests of fermentation carbohydrate and phosphomolybdate assay. Observation results show that isolate yeasts code YFJ-1, YFJ-3, and YFJ-4 can be classified into the class *Ascomycetes*.

Keywords: *corn seed, phytase, phytic acid, phosphate, yeast*

عزل وتوصيف خمير المحتملة المنتجة للفيتيز من بذور الذرة  
(*Zea mays L.*)

أبو إنتان سفطري، ليليك هارياني، أحمد بريزي

مستخلص البحث

الخمير هو كائن حي دقيق وحيد الخلية له العديد من الفوائد، أحدها قدرته على إنتاج إنزيمات الفاييتيز. تلعب إنزيمات الفاييتيز دورًا مهمًا في تحلل المركبات المضادة للتغذية مثل حمض الفيتيك في الحبوب. حمض الفيتيك قادر على ربط الفوسفور والمغذيات في البذور، وبالتالي تثبيط امتصاص العناصر الغذائية في الجهاز الهضمي للحيوانات، وخاصة أحادي المعدة. تهدف هذه البحث إلى تحديد نوع الخميرة الناتجة من بذور الذرة (*Zea mays L.*) والتي لها القدرة على إنتاج إنزيمات الفاييتيز حتى مستوى الصف. كانت الخطوة الأولية هو عزل الخمير من بذور الذرة، ثم متابعة عملية التنقية بحيث تم الحصول على خمس عزلات خميرة وتميزها YFJ-1، وYFJ-2 وYFJ-3 وYFJ-4 وYFJ-5. الخطوة التالية هي اختبار إنزيم الفاييتيز عن طريق الفحص باستخدام وسط أجار انتقائي للفيتيز (PSMA) والحصول على ثلاث عزلات ذات أعلى نشاط مائي والتي تم استخدامها لاحقًا كاختبارات أخرى، بما في ذلك العزلات YFJ-4 وYFJ-3 وYFJ-1 مع كل مؤشر تحلل مائي يبلغ 3.69 مم؛ 3.36 ملم و 3.26 ملم. إجراء اختبار نشاط إنزيم الفاييتيز باستخدام أداة قياس الطيف الضوئي 700 نانومتر وأخذ في الاعتبار نتائج نشاط الإنزيم بناءً على المنحنى القياسي لمحلول  $KH_2PO_4$  بتركيزات 0 و 10 و 20 و 30 و 45 و 50 جزء في المليون. بناءً على اختبار نشاط إنزيم الفاييتيز، كان لعزل YFJ-4 أعلى نشاط فيتيز عند 0.144 وحدة / مل  $\pm 9.501$  وحدة / مل، عزل YFJ-3 عند 0.117 وحدة / مل  $\pm 6.831$  وحدة / مل و YFJ-1 عند 0.093 وحدة / مل  $\pm 3.873$  وحدة / مل. بعد ذلك تحديد الخمائر المنتجة للفيتيز بناءً على الخصائص المورفولوجية الميكروسكوبية والميكروسكوبية، بالإضافة إلى الاختبارات البيوكيميائية لتخمير الكربوهيدرات واختبارات الفوسفات فوسفوموليبيدات. أظهرت النتائج أن عزلات الخمير YFJ-1 وYFJ-3 وYFJ-4 يمكن تصنيفها في فئة *Ascomycetes*.

الكلمة الأساسية: الخمير، وحبوب الذرة وحمض الفيتيك والفيتيز

## KATA PENGANTAR

*Assalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh.*

Segala puji bagi Allah SWT atas segala nikmat, karunia dan Ridho-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dan studi di fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Sholawat serta salam tetap tercurahkan kepada junjungan kita Nabi Muhammad SAW, para keluarga, dan sahabat-sahabatnya. Semoga senantiasa diberi syafaatnya kelak. Penyusunan skripsi ini tentu tidak lepas dari bimbingan, bantuan dan dukungan dari berbagai pihak. Ucapakan terimakasih sebesar-besarnya kepada semua pihak yang terlibat dan telah membantu memenuhi skripsi ini, khususnya kepada:

1. Prof. Dr. M. Zainuddin, MA, selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
2. Dr. Sri Harini, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains & Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
3. Dr. Evika Sandi Savitri, M.Si selaku Ketua Prodi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
4. Ir. Liliek Harianie AR, M.P dan Dr. Ahmad Barizi M.A, selaku pembimbing I dan II, yang telah membimbing penulis dalam menyelesaikan naskah skripsi ini dengan penuh kesabaran dan keikhlasan.
5. Ruri Siti Resmisari, M.Si, selaku Dosen wali yang telah membimbing dan memberikan dorongan motivasi kepada penulis hingga dapat menyelesaikan studi.
6. Seluruh dosen, laboran dan staff administrasi di Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan bimbingan dan ilmu selama studi.
7. Orang tua tersayang dan keluarga besar penulis, yang selalu memberikan doa, nasihat dan semangat dalam menyelesaikan studi.
8. Sahabat-sahabat seperjuangan di Program Studi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu, yang selalu mensupport moral, nasihat, dan menjadi bagian dari perjalanan selama studi di Malang.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih banyak kekurangan dan penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi penulis khususnya, pembaca pada umumnya serta menambah khasanah ilmu pengetahuan.

Aamiin.

*Wassalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh*

Malang, 10 Juni 2022

Penulis

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>HALAMAN PERSETUJUAN.....</b>	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN .....</b>	<b>iii</b>
<b>LEMBAR PERSEMBAHAN .....</b>	<b>iv</b>
<b>MOTTO .....</b>	<b>v</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN.....</b>	<b>vi</b>
<b>HALAMAN PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI .....</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>ix</b>
<b>مستخلص البحث .....</b>	<b>x</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>xi</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR TABEL.....</b>	<b>xiv</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xv</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xvi</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	7
1.3 Tujuan Penelitian .....	7
1.4 Manfaat Penelitian .....	8
1.5 Batasan Masalah .....	8
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>10</b>
2.1 Khamir .....	10
2.2 Morfologi Khamir .....	12
2.3 Taksonomi Khamir .....	14
2.3.1 Kelas <i>Ascomycetes</i> .....	15
2.3.2 Kelas <i>Basidiomycetes</i> .....	18
2.4 Fitase .....	20
2.4.1 Asam Fitat dan Dampak Negatifnya .....	20
2.4.2 Peranan Enzim Fitase dalam Hidrolisis Asam Fitat .....	24
2.4.3 Mekanisme Kerja Fitase .....	25
2.4.4 Sumber Fitase.....	26
2.5 Jagung .....	27
2.4.1 Morfologi Jagung.....	28
2.4.2 Biji Jagung .....	29
2.4.2 Biji Jagung Sebagai Pakan Ternak .....	32

<b>BAB III METODE PENELITIAN .....</b>	<b>35</b>
3.1 Rancangan Penelitian .....	35
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian .....	35
3.3 Alat dan Bahan .....	36
3.3.1 Alat Penelitian .....	36
3.3.2 Bahan Penelitian .....	36
3.4 Prosedur Penelitian .....	36
3.4.1 Pembuatan Media .....	36
3.5 Langkah Kerja .....	
3.5.1 Sterilisasi Alat dan Bahan .....	40
3.5.2 Isolasi Khamir dari Biji Jagung .....	41
3.5.3 Purifikasi Khamir .....	42
3.5.4 Uji Enzim Fitase .....	42
3.5.5 Pengamatan Morfologi Khamir .....	44
3.5.6 Pengamatan Secara Biokimia .....	46
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>48</b>
4.1 Uji Enzim Fitase.....	48
4.1.1 Isolasi dan Skrining Khamir Potensial Penghasil Fitase dari Biji Jagung .....	48
4.1.2 Uji Aktivitas Fitase .....	54
4.2 Identifikasi Morfologi.....	58
4.2.1 Isolat Khamir Kode YFJ-1 .....	61
4.2.2 Isolat Khamir Kode YFJ-3 .....	63
4.2.3 Isolat Khamir Kode YFJ-4 .....	65
4.3 Identifikasi biokimia .....	68
4.3.1 Uji Fermentasi Karbohidrat .....	68
4.3.2 Uji fosfat .....	71
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>75</b>
5.1 Kesimpulan .....	75
5.2 Saran.....	76
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>77</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>91</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Karakteristik Morfologi Khamir .....	52
Tabel 4.2 Zona Bening Hasil Skrining Fitase pada Media PSMA .....	55
Tabel 4.3 Kemampuan Isolat Khamir dalam Memfermentasi Karbohidrat Setelah 7 Hari Inkubasi .....	73
Tabel 4.4 Kemampuan Isolat Khamir dalam Perubahan pH .....	74
Tabel 4.5 Reaksi Biru Molibdenum pada Isolat Khamir dari Biji Jagung dengan Media Pikovskaya Broth.....	78
Tabel 4.6 Reaksi Biru Molibdenum pada Isolat Khamir dari Biji Jagung dengan Media PSMB .....	78

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Bentuk- Bentuk Sel Khamir .....	14
Gambar 2.2. Struktur Kimia Asam Fitat .....	24
Gambar 2.3. Proses Hidrolisis Fitat Oleh Fitase .....	26
Gambar 2.4. Struktur Biji Jagung .....	32
Gambar 4.1. Zona Bening Hasil Skrining Fitase pada Media PSMA.....	54
Gambar 4.2. Aktivitas Fitase Isolat Khamir dari Biji Jagung .....	59
Gambar 4.3. Koloni Isolat YFJ-1 .....	65
Gambar 4.4. Sel Isolat YFJ-1 .....	66
Gambar 4.5. Koloni Isolat YFJ-3 .....	68
Gambar 4.6. Sel Isolat YFJ-3 .....	69
Gambar 4.7. Koloni Isolat YFJ-4 .....	70
Gambar 4.8. Sel Isolat YFJ-4 .....	71

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Diagram Alir Prosedur Penelitian.....	105
Lampiran 2	Perhitungan Uji Kadar Fosfat .....	106
Lampiran 3	Hasil Skrining Fitase Isolat Khamir dari Biji Jagung dengan Media PSMA.....	109
Lampiran 4	Uji Aktivitas Fitase .....	111
Lampiran 5	Hasil Pengujian Fermentasi Karbohidrat Selama 7 Hari ....	114
Lampiran 6	Hasil Uji Fosfat.....	117

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Keanekaragaman hayati Indonesia sangat beragam, mulai dari flora, fauna, hingga mikroorganisme yang melimpah, tidak terbatas (Jumiyati *et al.*, 2012). Salah satunya yakni khamir yang merupakan golongan mikroba dalam kelompok jamur uniseluler (Turker, 2014). Khamir memiliki ketahanan terhadap antibiotik, memiliki sifat antibakteri, dan tahan terhadap garam, asam, dan gula (Roostita, 1993). Selain itu, ada beberapa jenis khamir yang dapat hidup di daerah ekstrim (Kanti, 2004). Daerah distribusi yang luas memberikan khamir tingkat keragaman yang tinggi. Menurut Kurtzman & Piskur (2006), keanekaragaman khamir yang ditemukan saat ini hanya menyumbang sekitar 1% dari total perkiraan keanekaragaman khamir di dunia, dimana 42% di antaranya terdapat di Indonesia.

Kemampuan khamir dalam bertahan hidup sangatlah tinggi untuk makhluk berukuran kecil. Kemampuan tersebut merupakan anugerah kenikmatan yang diberikan Allah swt. untuk khamir, juga menunjukkan kepada hamba-hambanya bahwasanya Allah swt. merupakan Tuhan yang maha adil pada setiap makhluknya. Hal tersebut telah dicantumkan Allah swt. melalui Al-Qur'an surat Hud ayat 6:

وَمَا مِنْ دَابَّةٍ فِي الْأَرْضِ إِلَّا عَلَى اللَّهِ رِزْقُهَا وَيَعْلَمُ مُسْتَقَرَّهَا وَمُسْتَوْدَعَهَا ۗ كُلُّ فِي كِتَابٍ مُبِينٍ

Artinya:

“Dan tidak ada suatu binatang melata pun di bumi melainkan Allah-lah yang memberi rezekinya, dan Dia mengetahui tempat berdiam binatang itu dan tempat penyimpanannya. Semuanya tertulis dalam Kitab yang nyata (Lauh mahfuzh)” (Qs. Hud/11:6).

Ayat diatas menjelaskan bahwasanya Allah swt. telah menjamin rezeki seluruh makhluknya baik yang berada di lautan maupun di daratan, termasuk juga binatang melata yang ada di bumi baik yang berukuran besar maupun berukuran kecil hingga keukuran mikro. Departemen Agama Republik Indonesia (2010) menafsirkan ayat tersebut melalui buku *Al-quran dan Tafsirnya* bahwasanya semua binatang yang melata, baik yang bergerak secara merayap, merangkak, ataupun yang berjalan dengan kedua kakinya, semuanya telah diatur dan dijamin rizkinya oleh Allah swt. dengan diberikannya naluri dan kemampuan mencari rizki sesuai dengan fitrah kejadiannya, sehingga selalu ada keserasian. Seperti yang dijelaskan pada Surat Saba’ ayat 3:

وَقَالَ الَّذِينَ كَفَرُوا لَا تَأْتِينَا السَّاعَةُ ۗ قُلْ بَلَىٰ وَرَبِّي لَأَتَانِيكُمْ عِلْمَ الْغَيْبِ لَا يُعْزِبُ عَنْهُ مِثْقَالَ ذَرَّةٍ فِي السَّمَوَاتِ وَلَا فِي الْأَرْضِ وَلَا أَصْغَرُ مِنْ ذَلِكَ وَلَا أَكْبَرُ إِلَّا فِي كِتَابٍ مُبِينٍ.

Artinya:

“Tidak ada tersembunyi daripada-Nya sebesar zarahpun yang ada di langit dan yang ada di bumi dan tidak ada (pula) yang lebih kecil dari itu dan yang lebih besar, melainkan tersebut dalam Kitab yang nyata (Lauh Mahfuzh)” (Qs. Saba/34:3).

Ayat tersebut menerangkan bahwasanya Allah SWT mengetahui segala hal yang ada di bumi dan langit, baik yang berukuran besar maupun yang berukuran kecil, sekecil dzarrah yang dapat diartikan sebagai mikroorganisme yang semuanya telah tercatat dan diatur serapi-rapinya di Lauh Mahfudz yang berisi

semua perencanaan dan pelaksanaan dari seluruh ciptaan Allah swt. secara menyeluruh dan sempurna.

Khamir telah berkontribusi dalam bidang pangan, terutama berperan penting dalam membantu proses fermentasi (Zarei *et al.*, 2016). Tidak hanya fermentasi, khamir juga memiliki banyak manfaat, diantaranya berperan penting sebagai agen bioremediasi (Shumin *et.al.*, 2012), berperan besar dalam proses pembuatan bioethanol (Sartini *et al.*, 2018), dan juga memiliki kemampuan menghidrolisis asam fitat dalam biji-bijian sehingga meningkatkan kualitas pangan dan pakan (Yanuartono *et al.*, 2017).

Biji-bijian seperti sereal, legum, dan *oil seed plant* merupakan salah satu sumber nutrisi yang penting untuk hewan. Hal ini dikarenakan di dalam biji-bijian diketahui mengandung karbohidrat, protein, lemak, dan sumber mineral seperti P, Ca, Fe, dan Zn yang penting untuk pertumbuhan hewan (Morris, 1986). Biji-bijian tidak hanya mengandung nutrisi, namun di dalamnya juga mengandung suatu senyawa anti-nutrisi yang menyebabkan nilai nutrisi atau nilai gizi menjadi rendah, senyawa tersebut dikenal sebagai asam fitat (Yanuartono *et al.*, 2017).

Asam fitat (*myo-inositol heksakis phosphate*) bersifat antinutrisi karena memiliki fosfat bermuatan negatif yang besar sehingga mampu berikatan dengan kation divalent, protein, dan karbohidrat (Yanuartono *et al.*, 2017). Asam fitat sebenarnya merupakan senyawa alami tanaman yang berperan sebagai cadangan asam fosfat sehingga menjadi sumber energi untuk proses perkecambahan (Djokorijanto, 1986). Berdasarkan hasil studi Steiner *et al.* (2007), terdapat sekitar 67% dari total P dalam biji-bijian dan limbah sereal berikatan dengan asam fitat.

Asam fitat memiliki peranan yang penting untuk tumbuhan, namun negatif dalam segi pangan dan pakan karena bersifat anti-nutrisi, khususnya bagi hewan non-ruminansia.

Fosfor yang terikat asam fitat tidak dapat dimanfaatkan oleh tubuh sehingga diekskresikan bersama tinja dan urin yang kemudian menyebabkan kandungan fosfor tanah meningkat dan mengakibatkan pencemaran lingkungan (Mittal *et al.*, 2011). Langkah dalam menanggulangi dampak negatif asam fitat dan secara bersamaan memenuhi kebutuhan fosfor ternak, maka suplementasi enzim fitase ke dalam ransum dapat menjadi solusi yang tepat. Khan *et al.* (2013) menyatakan bahwa penambahan fitase dalam ransum ternak unggas dapat meningkatkan proses hidrolisis asam fitat sehingga meningkatkan ketersediaan mineral, asam amino dan energi bagi ternak.

Fitase (*myo-inositol heksakisfosfat fosfohidrolase*) termasuk kelompok enzim *Phosphatase* yang dapat menghidrolisis ikatan fosfoester pada asam fitat, menghasilkan fosfat anorganik dan ester fosfat (Sari, 2012). Enzim fitase umumnya diproduksi oleh jaringan hewan, jaringan tanaman, dan mikroorganisme (bakteri, jamur, *yeast*) (Kerovuo *et al.*, 1998). Namun, enzim fitase asal mikroorganisme memiliki aktivitas fitase yang lebih tinggi dibanding fitase asal tanaman dan hewan (Cao *et al.*, 2007).

Fitase telah banyak diisolasi dari berbagai mikroba, salah satunya khamir (Santoso & Sajidan, 2013). Menurut Stahl *et al.* (2000), terdapat laporan tentang suplementasi fitase asal khamir untuk meningkatkan status gizi pakan. Terdapat beberapa jenis khamir yang dilaporkan menghasilkan enzim fitase, diantaranya

*Pichia anomala* (Vohra & Satyanarayana, 2001), *Schwanniomyces castellii* (Segueilha *et al.*, 1992), *Arxula adenivorans* (Sano *et al.*, 1999), dan *Saccharomyces cerevisiae* (Nuobariene *et al.*, 2012).

Fitase dari khamir merupakan salah satu fitase ideal karena sifat khamir yang non-patogen dan berstatus GRAS (*Generally Regarded As Safe*) (Ramadhan, 2016). Selain itu khamir juga memiliki kemampuan fermentasi yang mampu meningkatkan pencernaan protein dan karbohidrat serta ketersediaan mineral serta menurunkan tingkat anti-nutrisi seperti asam fitat dan polifenol (Dhanker dan Cauhan, 1987). Khamir memiliki habitat yang luas, salah satunya pada biji jagung yang mengandung karbohidrat tinggi. Menurut Sastrohamidjojo (2005) salah satu indikator habitat dari khamir adalah kandungan karbohidratnya.

Di beberapa daerah di Indonesia, jagung menjadi bahan pokok pangan masyarakat juga memiliki andil terbesar sebagai bahan pakan ternak dibandingkan dengan bahan yang lain (Dewanto *et al.*, 2013). Jagung menjadi sumber energi utama pakan dan berkontribusi besar dalam formula ransum unggas, khususnya ayam. Menurut Yanuartono (2017), jagung menyumbang lebih dari separuh energi yang dibutuhkan ayam, baik itu ayam boiler maupun petelur. Hal ini didasarkan pada potensi jagung sebagai sumber energi utama pakan, terutama untuk ternak monogastrik karena kandungan energi metabolis (EM) Jagung relatif tinggi dibanding bahan pakan lainnya (Sariubang & Herniwati, 2011).

Isolasi khamir pada penelitian ini diambil dari biji Jagung kristal yang umumnya digunakan sebagai bahan pakan unggas. Di dalam biji Jagung sendiri terdapat fitase yang mampu menurunkan level asam fitat, namun aktivitas

fitasenyanya rendah (Yanuartono, 2017). Hal tersebut juga menjadikan khamir endofit biji jagung yang digunakan sebagai objek dalam penelitian ini karena fungi endofit bisa menghasilkan metabolit sekunder yang sama dengan inangnya (Kusari *et al.*, 2011). Selain itu, fitase asal mikroorganisme memiliki aktivitas fitase yang lebih tinggi dibandingkan aktivitas fitase asal tumbuhan dan hewan (Cao *et al.*, 2007).

Penelitian ini dilakukan berdasarkan acuan penelitian sebelumnya yang berhasil mengisolasi dan mengidentifikasi khamir *Saccharomyces cerevisiae* dari biji jagung yang menghasilkan fitase (Orole & Adejumo, 2011). Beberapa penelitian telah mengidentifikasi bahwasanya *Saccharomyces cerevisiae* memiliki kemampuan dalam menghasilkan enzim fitase dari hasil metabolit sekundernya (Johnson & Carlos, 2011; Nuobariene *et al.*, 2012; Orole & Adejumo, 2011).

Uji fermentasi juga dilakukan pada penelitian ini, yakni dengan menggunakan fruktosa, glukosa dan sukrosa sebagai sumber karbohidratnya. Menurut Suarni & Widowati (2001) glukosa, fruktosa, dan sukrosa merupakan gula alami jagung. Uji fermentasi dilakukan untuk mendukung karakterisasi strain khamir dan juga mampu menurunkan kadar asam fitat. Hal ini dikarenakan proses fermentasi dapat menurunkan hingga menghilangkan faktor antinutrisi (Lim *et al.*, 2010; Yanuartono, 2017). Selain itu, khamir juga memiliki kemampuan alami dalam proses fermentasi (Balarabe *et al.*, 2017). Tujuan dari penelitian ini diharapkan peneliti dapat mengisolasi dan mengkarakterisasi khamir asal biji jagung yang memiliki kemampuan dalam menghidrolisis asam fitat berdasarkan

hasil uji aktivitas fitase dengan pengamatan mikroskopik, makroskopik, dan biokimia.

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang dikaji pada penelitian ini adalah:

1. Apakah khamir hasil isolasi dari biji jagung (*Zea mays*) memiliki potensi dalam menghasilkan enzim fitase?
2. Apa saja jenis khamir potensial penghasil fitase yang berhasil diisolasi dari biji jagung (*Zea mays*) berdasarkan karakteristik morfologi secara makroskopik dan mikroskopik hingga mengetahui tingkat sub kelas?
3. Bagaimana kemampuan khamir potensial penghasil fitase dari biji jagung (*Zea mays*) terhadap uji fosfat dan uji fermentasi karbohidrat dari sumber karbohidrat fruktosa, glukosa, sukrosa?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui potensi khamir dari biji jagung (*Zea mays*) dalam menghasilkan enzim fitase.
2. Mengetahui jenis khamir potensial penghasil fitase yang berhasil diisolasi dari biji jagung (*Zea Mays*) hingga tingkat sub kelas berdasarkan karakteristik morfologi makroskopik dan mikroskopik.

3. Mengetahui kemampuan khamir potensial penghasil fitase yang berhasil diisolasi dari biji jagung (*Zea mays*) terhadap uji fosfat dan uji fermentasi karbohidrat dari sumber karbohidrat fruktosa, glukosa, sukrosa.

#### **1.4 Manfaat Penelitian**

Manfaat yang diperoleh dari penelitian ini yakni:

1. Penelitian ini dapat menginformasikan strain khamir asal biji jagung (*Zea mays*) yang dapat memproduksi enzim fitase.
2. Penelitian ini diharapkan dapat menjadi acuan dalam penelitian lanjutan mengenai potensi khamir dalam menghasilkan enzim fitase, khususnya enzim fitase asal khamir jagung.

#### **1.5 Batasan Masalah**

Batasan penelitian pada penelitian ini adalah sebagai berikut;

1. Khamir yang diisolasi dan di uji merupakan khamir endofit dari biji jagung kristal.
2. Media yang digunakan untuk isolasi khamir dari biji jagung yakni YMB (*Yeast Malt Broth*).
3. Media yang digunakan untuk media pertumbuhan khamir yakni YMEA (*Yeast Malt Extract Agar*)
4. Media yang digunakan untuk skrining enzim fitase yaitu media PSMA (*Phytase Selektif Medium Agar*).

5. Media yang digunakan untuk ekstrak enzim kasar fitase yaitu media PSMB (*Phytase Selektif Medium Broth*).
6. Sumber substrat yang digunakan untuk uji fitase yakni Ca-fitat.
7. Uji enzim fitase pada khamir asal biji jagung dilakukan dengan dua tahap pengujian, diantaranya uji skrining fitase dan uji spektrofotometri.
8. Uji spektrofotometri dilakukan pada tiga isolat khamir dengan zona hidrolitik tertinggi.
9. Aktivitas fitase pada khamir asal biji jagung ditentukan berdasarkan data hasil spektrofotometer dan perhitungan rumus aktivitas fitase.
10. Uji morfologi dan biokimia pada khamir dilakukan untuk menentukan taksonomi khamir di tingkat sub kelas.
11. Pengamatan morfologi khamir dilakukan berdasarkan karakter makroskopis dan mikroskopis yakni permukaan, tekstur, bentuk, warna, elevasi, tepian, reproduksi dan ukuran sel khamir.
12. Pengamatan biokimia dilakukan dengan uji fosfat dan uji fermentasi karbohidrat sumber fruktosa, glukosa, sukrosa.

## **BAB II TINJAUAN PUSTAKA**

### **2.1 Khamir**

Khamir merupakan mikroorganisme dari golongan fungi yang bersifat heterotrof, umumnya uniseluler, dan mampu hidup sebagai saprofit ataupun parasit (Kurtzman, C. P. dan Fell, 1998). Khamir memiliki keanekaragaman hayati yang tinggi, hal ini dipengaruhi oleh tingkat persebaran yang luas, diantaranya mampu hidup di lingkungan akuatik, terrestrial, maupun di atmosfer (Waluyo, 2008). Selain itu, beberapa spesies khamir dapat diisolasi dari lingkungan khusus atau ekstrim, dengan konsentrasi gula atau garam tinggi (yaitu, potensi air rendah), dengan suhu rendah, dan dengan ketersediaan oksigen rendah (Walker, 2009).

Keanekaragaman khamir yang ditemukan saat ini hanya menyumbang sekitar 1% dari total perkiraan keanekaragaman khamir di dunia, dimana 42% di antaranya terdapat di Indonesia (Kurtzman & Piskur, 2006). Pada tumbuhan, khamir bisa ditemukan di dalam biji, batang, daun, bunga, dan buah. Menurut Walker (2009), khamir lebih menyukai jaringan tanaman sebagai habitatnya. Khamir ini umumnya dikenal sebagai khamir endofit.

Khamir endofit merupakan khamir yang ada dan memiliki habitat di dalam tanaman. Penamaan endofit berasal dari dua kata yang memiliki arti tersendiri, yaitu: *endon* berarti “di dalam” dan *pyton* yang berarti “tanaman”. Berdasarkan makna arti kata tersebut, maka dapat disimpulkan bahwa pengertian fungi endofit

mengacu pada mikroorganisme yang mampu hidup dalam jaringan tubuh tanaman dan tidak memiliki potensi sebagai parasit yang dapat merusak atau membahayakan inangnya. Mikroorganisme yang dimaksud dapat berupa bakteri, fungi, dan yeast (Schulze dan Boyle, 2006). Khamir endofit secara umum merupakan khamir yang berasosiasi didalam jaringan tumbuhan seperti pada bunga, buah, daun, ranting bahkan akar tumbuhan (Worang, 2003).

Mikroorganisme endofit mampu menghasilkan senyawa bioaktif yang sama dengan tumbuhan inangnya. Senyawa bioaktif ini digunakan dalam mengoptimalkan system metabolisme tumbuhan, proteksi terhadap penyakit maupun pathogen, serta menambah nilai potensi pada tumbuhan inang (Strobel *et al.*, 2004; Staniek *et al.*, 2008; Aly *et al.*, 2010; Kharwar *et al.*, 2011; Kusari & Spitteller, 2012). Senyawa bioaktif asal fungi endofit bisa didapatkan dengan memperhatikan beberapa parameter proses, diantaranya pH, suhu, tempat sampling, dan komposisi media (Kusari *et al.*, 2011).

Khamir endofit merupakan mikroorganisme yang mudah ditumbuhkan, memiliki siklus hidup yang pendek dan dapat menghasilkan jumlah senyawa bioaktif dalam jumlah besar dengan metode fermentasi (Hasiani *et al.*, 2015). Kondisi suhu optimal yang diperlukan untuk pertumbuhan khamir adalah suhu berkisar antara 25-30°C dengan kelembapan yang sesuai dan nutrisi yang cukup pertumbuhan khamir dapat berjalan secara optimal (Yousif & Shafa, 2014).

Khamir memiliki stuktur yang dinding selnya terbentuk dari polisakarida yang tebal. Secara umum khamir bereproduksi dengan cara aseksual yang sering disebut dengan reproduksi pertunasan. Terdapat sel induk yang memanjang dan

diikuti dengan tunas yang sering disebut dengan sel anak, kemudian saat bereproduksi sel induk dan tunas saling memisahkan diri (Subandi, 2010). Sel khamir memiliki bentuk yang bermacam-macam yaitu terdapat yang berbentuk bulat, oval, silinder, batang, melengkung seperti segitiga, menyerupai bentuk botol dan terdapat khamir yang membentuk pseudomiselium (Fardiaz, 2009).

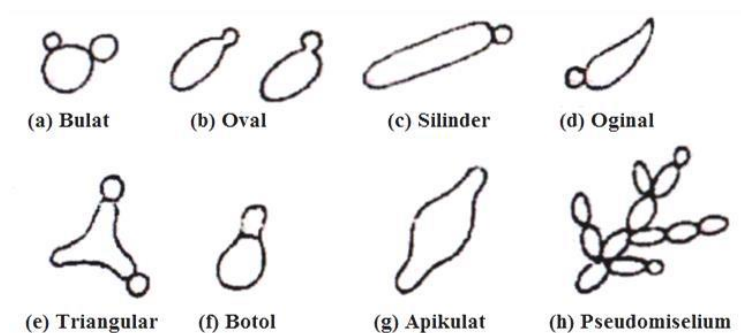
Khamir secara umum dapat diidentifikasi dan diklasifikasikan berdasarkan hasil pengamatan morfologi, fisiologi dan biokimia. Identifikasi khamir secara morfologi dapat dilakukan melalui pengamatan koloni dan sel. Karakter morfologi koloni dapat diidentifikasi berdasarkan warna, bentuk, elevasi, tepi, dan tekstur koloni, sedangkan karakter morfologi sel dapat diidentifikasi berdasarkan bentuk, diameter, *Pseudohifa*, dan *Ascospore* (Wiratno & novi, 2018). Sedangkan pengamatan biokimia pada yeast dapat dilakukan dengan uji fermentasi karbohidrat (Suryaningsih, 2018).

## 2.2 Morfologi Khamir

Di dalam klasifikasi dan identifikasi khamir memiliki kaitan penting dengan morfologi dan fisiologi khamir. Morfologi khamir dibagi menjadi morfologi mikroskopik dan makroskopik. Morfologi mikroskopik terdiri dari ukuran sel, bentuk sel dan reproduksi sel yang digunakan untuk membedakan khamir. Ukuran sel dan bentuk sel digunakan sebagai parameter untuk membedakan antara *kelas* dengan *genus* (De Becze, 1955).

Khamir memiliki ukuran yang bervariasi, biasanya memiliki panjang 1-5  $\mu\text{m}$ , lebar 1-10  $\mu\text{m}$ , diameter 3 – 4  $\mu\text{m}$ , dan ada yang mencapai 20  $\mu\text{m}$  hingga 40

$\mu\text{m}$  (Bhatia, 2016). Sel khamir memiliki bentuk yang beraneka macam, yaitu globe, bola, telur, zaitun, silinder bulat, ovoid, sperikal, oval, spheroid, silinder (Ashlihah dan Alami, 2014), segitiga melengkung, batang, botol, lemon atau apikulat dan membentuk pseudohifa atau miselium (pseudomiselium) (Fardiaz, 1992). Isolat khamir yang tidak membentuk hifa sejati (*Truephypha*) dapat ditemukan pada khamir *Trichosporon* spp., sedangkan khamir yang tidak memiliki hifa semu (*Pseudophypha*) dapat ditemukan pada *Kluyveromyces* spp., dan *Pichia* spp., (Kurtzman, C. P. dan Fell, 1998). Gandjar, I. dan Sjamsuridzal (2006) menambahkan bahwa bentuk sel khamir dapat dipengaruhi oleh medium tumbuhnya.



**Gambar 2.1. Bentuk- bentuk sel khamir (Sumber: Rini, 2017)**

Morfologi makroskopis terdiri dari tekstur koloni, bentuk koloni, permukaan koloni, warna koloni, margin koloni dan elevasi koloni. Identifikasi morfologi dapat menunjukkan awal perbedaan antar koloni khamir. Morfologi makroskopis yaitu pada *Kelas Basidiomycetes* dan *Kelas Ascomycetes*. *Kelas Basidiomycetes* memiliki pigmen berwarna terang, seperti merah, merah muda,

jingga, sedangkan *Kelas Ascomycetes* memiliki warna dominan, seperti krem dan putih karena tidak memiliki pigmen. (Kurtzman, C. P. dan Fell, 1998). Pelczar, M. J. (1998), menyatakan bahwa secara makroskopis khamir memiliki ciri- ciri koloni yaitu terdapat spora, tidak berlendir, tidak mengkilat, dan berwarna putih kekuningan atau putih susu. Hal ini didukung oleh penelitian (Spencer, 1997), hampir 90% khamir mempunyai penampakan morfologi putih kekuningan.

### **2.3 Taksonomi Khamir**

Taksonomi merupakan ilmu yang mempelajari tentang identifikasi dan klasifikasi. Khamir merupakan mikroorganisme eukariotik uniseluler yang menurut taksonomi tergolong ke dalam Kingdom *Eumycota*. Spesies khamir tergolong dalam Kingdom *Eumycota* yaitu *Kelas Ascomycetes* dan *Kelas Basidiomycetes*. Khamir *Kelas Basidiomycetes* menghasilkan basidiospora (*Basidiosporogenous*), sedangkan khamir *Kelas Ascomycetes* menghasilkan askospora (*Ascosporogenous*) dalam melakukan reproduksi seksualnya (Kurtzman & Fell, 1998). Khamir yang terdapat dalam kelas *Basidiomycetes* dan *Ascomycetes* terdiri dari khamir anamorfik dan khamir telemorfik. (Querol & Fleet, 2006). Khamir yang ditemukan fase seksualnya dikelompokkan sebagai khamir telemorfik, sedangkan khamir yang ditemukan fase aseksualnya dikelompokkan sebagai khamir anamorfik atau *conidial yeast* (Gandjar & Sjamsuridzal, 2006). Nama genus diberikan dalam taksonomi khamir berdasarkan fase reproduksinya yaitu anamorfik atau telemorfik (Yarrow, 1998).

Berdasarkan pertumbuhannya terhadap makanan khamir diklasifikasikan menjadi beberapa tipe khamir di antaranya, yaitu *film yeast*, *lactose fermenting yeast*, *alcohol yeast*, *lemon shape yeast* atau *apiculate*, *food and feet yeast* dan *osmophilic yeast* (Kurtzman *et al.*, 2011). *Film yeast* yaitu khamir yang mempunyai kemampuan terhadap oksidasi asam- asam organik, metabolisme terhadap permukaan makanan yang bersifat asam dan resisten pada kondisi lingkungan asam (Sari *et al.*, 2010). *Lactose fermenting yeast* yaitu khamir yang dapat memfermentasi karbohidrat sederhana misalnya laktosa yang ada di dalam susu. *Alcohol yeast* yaitu khamir yang mempunyai kemampuan dapat memfermentasi alkohol. *Lemon shape yeast* atau *apiculate* yaitu khamir yang mempunyai kemampuan mengacaukan fermentasi wine, *off- flavor* dan membentuk alkohol dan asam volatil tinggi. *Food and feet yeast* yaitu khamir yang banyak dimanfaatkan untuk bahan pakan ternak dan bahan pangan, seperti protein sel tunggal *Osmophilic yeast* yaitu khamir yang resisten pada lingkungan dengan kadar garam dan gula yang tinggi (Kanti & Sumerta, 2017).

### **2.3.1 Kelas *Ascomycetes***

Khamir Kelas *Ascomycetes* memproduksi askospora pada struktur *askus* sebagai reproduksi seksualnya. Pertunasan secara holoblastik menjadi karakteristik khamir kelas *Ascomycetes* sebagai reproduksi aseksualnya dan memiliki dinding sel yaitu *bilayer* (dua lapis). Pertunasan holoblastik merupakan pertunasan yang terjadi pada ujung sel yang membengkak yang kemudian menggelembung menjadi sel reproduksi yang dapat melepaskan diri dari sel induk

(Gandjar & Sjamsuridzal, 2006). Berdasarkan posisi tempat terjadinya pertunasan, pertunasan di bagi menjadi empat tipe, diantaranya pertunasan monopolar, pertunasan yang terjadi di satu kutub saja; pertunasan bipolar, pertunasan yang terjadi di dua kutub; dan pertunasan multi lateral atau multi polar merupakan pertunasan yang terjadi di beberapa tempat pada permukaan sel (Gandjar & Sjamsuridzal, 2006).

Analisis sequence daerah gen rRNA kelas *Ascomycetes* terdiri atas tiga subkelas yakni *Archiascomycetes*, *Euascomycetes*, dan *Hemiascomycetes* (Kurtzman & Sugiyama, 2001). Subkelas *Archiascomycetes* terdiri atas ordo *Pneumocystidales*, *Neolactales*, *Protomycetales*, *Schizosaccharomycetales*, *Taphrinales*, dan khamir-khamir anggota genus *Saitoella*. Subkelas *Hemiascomycetes* terdiri atas ordo *Saccharomycetales* yang terdiri atas 11 famili, di antaranya *Candidaceae*, *Metschnikowiaceae*, dan *Saccharomycetaceae* (Kurtzman & Fell, 1998).

### **2.3.1.1 Subkelas *Archiascomycetes***

Khamir subkelas *Archiascomycetes* memiliki dinding sel dua lapis (*bilayer*), bagian askus tidak ditutupi askokarp dan melakukan pembelahan sel atau pembentukan *budding* enteroblastik sebagai reproduksi aseksualnya (Hamamoto & Nakase, 2000). Contoh khamir yang termasuk telemorfik yaitu genus *Protomyces* Unger dan *Schizosaccharomyces* Lindner, sedangkan khamir yang termasuk anamorfik yaitu genus *Lalaria* R.T. Moore. Genus *Lalaria* memiliki koloni dengan warna kekuningan atau merah muda dan secara

mikroskopis memiliki reproduksi vegetatif yaitu budding dekat kutub atau keluar kutub sel (Kurtzman & Fell, 1998).

### **2.3.1.2 Subkelas *Euascomycetes***

Khamir subkelas *Euascomycetes* termasuk ke dalam *yeast-like fungi*. Askus khamir subkelas *Euascomycetes* ditutupi oleh askokarp (Hamamoto & Nakase, 2000). Contoh khamir yang termasuk kedalam *anamorfik* yaitu genus *Aureobasidium*. Khamir lainnya yaitu dari anggota genus *Endomyces* dan *Oosporidium* (Boekhout dan Phaff, 2003). Berdasarkan morfologi makroskopis, khamir *Endomyces scopularu* memiliki koloni dengan warna putih dan elevasi timbul (Kurtzman & Fell, 1998).

### **2.3.1.3 Subkelas *Hemiascomycetes***

Khamir subkelas *Hemiascomycetes* memiliki dinding sel lapis dua (*bilayer*), askus ditutupi oleh askokarp, dan pembentukan *budding* tipe holoblastik atau pembentukan arthrokonidia (Kurtzman & Sugiyama, 2001). Askokarp khamir subkelas *Hemiascomycetes* dibagi menjadi beberapa jenis, di antaranya yaitu *hemispheroidal*, *globose*, *spheroidal*, *hat-shaped*, *lenticular* dan *ovoidal* (Sari *et al.*, 2010). Contoh khamir yang termasuk kedalam teleomorfik yaitu genus *Debaryomyces* dan *Pichia*, sedangkan khamir yang termasuk kedalam anamorfik yaitu genus *Candida* dan *Saccharomyces*. Berdasarkan karakter morfologi makroskopisnya, khamir *Saccharomyces cerevisiae* memiliki tekstur

koloni seperti mentega dengan warna krem muda, elevasi timbul atau rata dan permukaan koloni halus (Kurtzman & Fell, 1998).

### 2.3.2 Kelas Basidiomycetes

Khamir Kelas *Basidiomycetes* memproduksi basidiospora pada struktur *basidium* sebagai reproduksi seksualnya (Kurtzman & Fell, 2006). Pertunasan secara enteroblastik menjadi karakteristik khamir kelas *Basidiomycetes* sebagai reproduksi aseksualnya dan memiliki dinding sel yaitu *multilayer* (banyak lapis). Kelas *Basidiomycetes* dibagi menjadi tiga subkelas berdasarkan analisis sequence daerah D1/D2 gen LSU rRNA yaitu *Hymenomycetes*, *Urediniomycetes*, dan *Ustilaginomycetes*. Subkelas *Hymenomycetes* terdiri atas empat *clade* yaitu *Tremellales*, *Trichosporonales*, *Filobasidiales*, dan *Cystofilobasidiales*. Subkelas *Ustilaginomycetes* terdiri atas tiga *clade* yaitu *Exobasidiomycetidae*, *Ustilaginomycetidae*, dan *Malasseziales*. Subkelas *Urediniomycetes* terdiri dari empat *clade* yaitu *Agaricostilbum*, *Microbotryum*, *Sporidiobolous* dan *Erythrobasidium* (Fell *et al.*, 2000).

#### 2.3.2.1 Subkelas *Hymenomycetes*

Khamir subkelas *Hymenomycetes* memiliki dinding sel yang terdiri dari komponen gula yaitu glukosa, xylosa dan mannososa dan tipe septa yaitu *dolipore* (Gandjar & Sjamsuridzal, 2006). Contoh khamir yang termasuk teleomorfik yaitu genus *Bulleromyces*, sedangkan khamir yang termasuk anamorfik yaitu genus *Bullera* (Satyanaraya, 2009). Berdasarkan morfologi makroskopisnya, koloni

khamir pada spesies *Bullera armeniaca* tampak mengkilap dan warna terang oranye atau oranye kemerahan, tekstur koloni seperti mentega, tipe elevasi yaitu datar dan timbul (Kurtzman & Fell, 1998).

### **2.3.2.2 Subkelas *Urediniomycetes***

Khamir subkelas *Urediniomycetes* memiliki dinding sel yang terdiri dari komponen gula yaitu glukosa, mannososa, fruktosa dan rhamnosa tetapi tidak terdapat xylosa (Satyanaraya, 2009). Contoh khamir yang termasuk teleomorfik yaitu genus *Rhodospiridium* Banno dan *Rhodotorula*, sedangkan khamir yang termasuk anamorfik yaitu genus *Rhodotorula* dan *Cryptococcus* Vuillemin. Berdasarkan morfologi makroskopisnya, spesies *Cystofilobasidium infirmominiatum* memiliki permukaan koloni yang halus dengan warna merah muda dan elevasi timbul (Kurtzman & Fell, 1998).

### **2.3.2.3 Subkelas *Ustilaginomycetes***

Khamir subkelas *Ustilaginomycetes* memiliki dinding sel yang terdiri dari komponen gula yaitu glukosa, mannososa dan galaktosa (Gandjar & Sjamsuridzal, 2006). Khamir *Ustilaginomycetes* tidak terdapat senyawa xylosa dan memiliki karakteristik tipe septa seperti *micropore* atau margin yang bertingkat. Contoh khamir yang termasuk anamorfik yaitu genus *Pseudozyma* Bandoni dan *Tilletiopsis* Derx, sedangkan yang termasuk teleomorfik yaitu genus *Ustilago* Corda (Satyanaraya, 2009). Berdasarkan morfologi makroskopisnya, spesies khamir *Pseudozyma aphidis* memiliki koloni yang berwarna putih hingga krem

agak kekuningan dan kusam, elevasi yaitu datar dan terdapat kandungan seperti tetesan minyak (Kurtzman & Fell, 1998).

## 2.4 Fitase

Fitase (*myo-inositol heksakisfosfat fosfohidrolase*) adalah enzim yang mengkatalis *myo-inositol hexakisphosphate* (fitat) menjadi *orthophosphate* anorganik dan serangkaian *phosphoric* yang lebih rendah (*inositol pentaphosphate* menjadi *monophosphate*) dan akhirnya menjadi *myo-inositol* bebas (Selle & Ravindran 2007). Fitase memiliki kontribusi yang besar dalam industri pakan ternak. Hal ini dikarenakan sekitar 80% komposisi pakan ternak berasal dari biji-bijian dan bungkil seperti jagung, kedelai, gandum, bungkil kedelai, bungkil kelapa, bungkil kelapa sawit, sorgum maupun 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).

### 2.4.1 Asam Fitat dan Dampak Negatifnya

Asam fitat (*myo inositol heksakisfosfat*) adalah senyawa kimia yang terdiri atas inositol dan asam fosfat dengan enam gugus asam fosfat yang terikat pada cincin inositol membentuk struktur kimia  $C_6H_{18}O_{24}P_6$  (Reddy *et al.*, 1982). Asam fitat merupakan bentuk penyimpanan fosfor terbesar pada tanaman serelia dan

leguminosa (Kumar *et al.*, 2010). Berdasarkan studi Steiner *et al.* (2007), terdapat sekitar 67% dari total P dalam biji-bijian dan limbah sereal berikatan dengan asam fitat

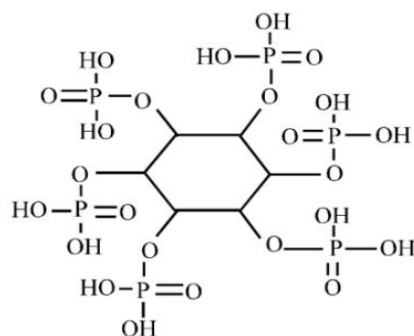
Asam fitat memiliki peranan yang penting pada pertumbuhan tanaman, hal ini dikarenakan asam fitat merupakan komponen esensial pada semua biji sebagai bentuk penyimpanan fosfor yang utama pada sereal, polong-polongan, dan *oil seed* (Amelia, 2010). Selama proses perkecambahan, unsur P dari asam fitat digunakan sebagai sumber nutrisi untuk pertumbuhan dan proses perkecambahan (Irwan, 2013). Asam fitat bersifat positif untuk pertumbuhan dan perkembangan tumbuhan namun asam fitat bersifat negatif pada hewan karena kemampuannya dalam mengikat fosfor serta berperan sebagai antinutrisi.

Sifat antinutrisi asam fitat didasarkan pada kemampuannya untuk mengikat mineral divalen seperti:  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ , serta fosfat dan protein yang berguna bagi pertumbuhan ternak (Nuhriawangsa, 2012). Hal ini membuat metabolit ion mineral tidak tersedia, terutama untuk ternak monogastrik yang tidak mampu menghasilkan enzim fitase dalam saluran pencernaan utamanya (Pujaningsih, 2004).

Mekanisme asam fitat dalam menurunkan pencernaan zat gizi pada ternak monogastrik, yaitu: (1) Membentuk ikatan dengan zat gizi dan enzim pencernaan dalam usus halus, selanjutnya menurunkan aktivitas enzim pencernaan dalam usus halus; (2) Membentuk ikatan dengan protein dan enzim pencernaan dalam lambung sehingga menurunkan aktivitas pepsin dalam lambung; dan (3) Membentuk ikatan dengan zat gizi *endogenous*, yang menyebabkan penurunan

tingkat penyerapan kembali zat gizi *endogenous* dalam usus halus (Woyengo & Nyachoti, 2013).

Senyawa fitat mempunyai efek pengkelat karena dapat berikatan dengan kation logam membentuk garam fitat (Bohn *et al.* 2008). Pembentukan kompleks mineral fitat yang tidak larut dapat menghambat penyerapan mineral pada saluran pencernaan, hal ini akan mengurangi ketersediaan mineral penting bagi tubuh (Kerovuo, 2000). Selain mengikat nutrisi mineral penting, asam fitat juga mampu mengurangi bioviabilitas protein bagi hewan (Liu, *et al.*, 1998). Asam fitat atau garam fitat merupakan inhibitor bagi enzim-enzim pencernaan seperti  $\alpha$ -amilase, lipase, pepsin, tripsin, maupun kimotripsin. Pengaruh inhibisi asam fitat atau garam fitat semakin kuat, seiring dengan meningkatnya konsentrasi fitat maupun bertambahnya gugus fosfat yang terikat pada mio-inositol (Kusumadjaja, 2009). Menurut Yao *et al.* (2011) asam fitat memiliki ikatan yang kompleks dengan pati, protein, dan mineral lain yang tidak mudah larut sehingga tidak dapat serap oleh usus.



**Gambar 2.2. Struktur kimia asam fitat (Coulibaly *et al.*, 2011)**

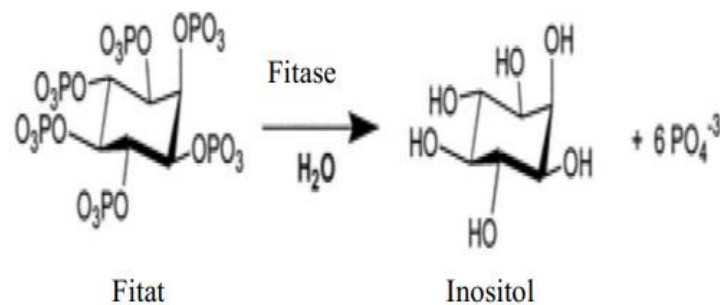
Asam fitat mengikat 6 molekul fosfor, Fosfor yang terikat tidak dapat dimanfaatkan oleh tubuh sehingga fosfor tersebut akan diekskresikan bersama

tinja dan urin sehingga dapat menyebabkan kandungan fosfor tanah meningkat dan mengakibatkan pencemaran lingkungan (Mittal *et al.*, 2011). Fosfor tidak hanya mencemari lingkungan, Rendahnya kandungan fosfor dan mineral lainnya dalam tubuh ternak monogastrik, membuat produktivitas ternak monogastrik menurun dan pertumbuhannya juga terhambat sehingga untuk memenuhi kebutuhan fosfat pada ternak umumnya peternak menambahkan fosfor dalam bentuk fosfat agar ketersediaanya cukup untuk ternak monogastrik sehingga meningkatkan biaya pakan melalui suplementasi P anorganik (Ahmad *et al.*, 2000). Fosfor merupakan zat gizi yang memiliki nilai ekonomi tertinggi ketiga dalam formulasi ransum setelah energi dan asam amino sehingga perlu dioptimalkan penggunaannya (Woyengo & Nyachoti, 2013).

Kandungan asam fitat dapat diturunkan bahkan dihilangkan dengan beberapa metode pengolahan seperti perendaman, perkecambahan perebusan, pemasakan dan fermentasi yang umumnya dipakai untuk pemrosesan biji tanaman, namun metode-metode tersebut biasanya akan menurunkan kandungan asam fitat dan meningkatkan kelarutan unsur hara (Selle and Ravindran 2008; Bilyeu *et al.*, 2008). Selain itu, terdapat metode suplementasi enzim fitase yang dapat meningkatkan proses hidrolisis asam fitat sehingga mampu menurunkan kadar asam fitat (Khan *et al.*, 2013). Metode pengolahan fisik kemungkinan akan efektif jika digunakan dalam skala kecil sehingga penggunaan enzim fitase akan lebih unggul jika digunakan dalam skala industri (Yanuartono *et al.*, 2017).

### 2.4.2 Peranan Enzim Fitase dalam Hidrolisis Asam Fitat

Suplementasi fitase pada ransum akan memacu proses hidrolisis asam fitat menjadi 1 molekul inositol, 6 molekul fosfat organik, ion  $\text{Ca}^{+}$ ,  $\text{Zn}^{+}$ , dan protein sehingga fosfat dan mineral yang terikat dapat dilepaskan dan dimanfaatkan oleh tubuh. Menurut Kusumadjaja *et al.* (2009), fitase menghidrolisis asam fitat dengan media air untuk menghasilkan mio inositol dan fosfat organik.



**Gambar 2.3. Proses hidrolisis fitat oleh fitase (Mittal *et al.*, 2011)**

Suplementasi fitase dilakukan untuk meningkatkan asupan fosfor dan mineral pada sistem pencernaan organisme monogastrik seperti ayam, ikan, babi, dan manusia. Ternak monogastrik seperti unggas, tidak mampu mendegradasi senyawa fitat namun penggunaan biji-bijian sebagai pakan membuat sekitar 50%-80% P pada pakan ternak berada dalam bentuk fitat atau asam fitat dan tidak dapat dicerna dalam saluran pencernaan unggas sehingga menurunkan nilai nutrisi bahan pakan yang berasal dari tanaman pertanian (Irwan, 2013).

Dampak buruk dari asam 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). Menurut Sutrisno (2017), penggunaan fitase tidak hanya melepaskan fosfor terikat tetapi juga nutrisi penting lainnya untuk meningkatkan nilai gizi pakan, serta terbukti mampu meningkatkan pertambahan berat tubuh rata-rata perhari hewan ternak (Kusumadjaja, 2009). Selain itu suplementasi fitase dapat mengurangi pencemaran lingkungan akibat asam fitat.

Penambahan enzim fitase ke dalam ransum dapat menjadi solusi yang tepat dalam menanggulangi efek negatif asam fitat. Khan *et al.* (2013) menyatakan bahwa penambahan fitase dalam ransum ternak unggas memiliki dampak pada peningkatan proses hidrolisis asam fitat sehingga meningkatkan ketersediaan mineral, asam amino dan energi bagi ternak, dimana pada akhirnya mengakibatkan terjadinya peningkatan kinerja pertumbuhan.

### **2.4.3 Mekanisme Kerja Fitase**

Proses pelepasan fosfor oleh fitase dalam saluran pencernaan ayam berdasarkan laporan Kathirvelan *et al.* (2015) yakni, fosfor yang terkandung dalam biji-bijian yang tersimpan sebagai kompleks mineral dan dikenal sebagai fitin. Fitin tersebut ketika dalam bentuk tidak kompleks disebut asam fitat. Asam fitat terdiri dari gula (mirip dengan glukosa) yang disebut *myo-inositol*, tempat dimana grup fosfat ( $PO_4$ ) terikat. Bioavailabilitas fosfor terikat fitat tersebut umumnya sangat rendah pada ternak ayam, karena ayam tidak memiliki kemampuan untuk memanfaatkan fosfor dalam bentuk tersebut (fosfor terikat fitat). Hanya fosfatase dan fitase yang mampu membebaskan fosfor terikat fitat

dari cincin *inositol* dan membuatnya tersedia untuk diserap dalam usus. Variasi kadar fosfor terikat fitat dalam bahan pakan ikut mempengaruhi ketersediaan fosfor.

Fitase melepaskan fosfat dari cincin *inositol* dimana pelepasan fosfor tersebut sangat tergantung pada kondisi pH usus. Dengan mekanisme kerja fitase dalam saluran pencernaan ayam tersebut, beberapa hasil percobaan penggunaan fitase dalam ransum ayam pedaging menunjukkan bahwa suplementasi fitase terbukti mampu meningkatkan pencernaan mineral, asam amino dan energi metabolis ransum (Woyengo *et al.*, 2008).

#### **2.4.4 Sumber Fitase**

Fitase secara umum berasal dari empat sumber, yakni fitase tanaman, fitase mikroba (jamur dan bakteri), fitase yang dihasilkan oleh mukosa usus kecil yang ditemukan pada feses hewan, dan fitase mikroflora pada usus (Kumar *et al.*, 2018). Aktivitas fitase pada hewan sangat rendah dibandingkan aktivitas fitase pada tumbuhan dan mikroorganisme (Weremko *et al.*, 1997 *cit* Cao *et al.*, 2007). Tumbuhan mengandung enzim fitase, namun aktivitas fitase dari tanaman ternyata jauh lebih kecil dibanding fitase dari mikroorganisme (Sajidan, 2004).

Fitase pada tanaman memiliki aktivitas yang rendah karena memiliki kisaran pH yang kecil dari 4 dan besar dari 8 serta tidak aktif pada suhu tinggi (Greiner & Konietzny, 2006). Sebaliknya, fitase dari mikroorganisme memiliki kisaran pH optimum yang luas, tahan suhu tinggi, dan aktivitas spesifiknya lebih tinggi sehingga menjanjikan untuk diaplikasikan dalam pembuatan pakan ternak

(Cao *et al.*, 2007). Hal ini membuat fitase asal mikroorganisme semakin dapat diterima untuk diaplikasikan dalam pakan dan sangat efektif dalam meningkatkan ketersediaan fosfor bagi hewan serta mengurangi polusi yang diakibatkan oleh fitat ke lingkungan (Kusharyoto, 2010). Fitase telah banyak diisolasi dari berbagai mikroorganisme, salah satunya khamir (Santoso & Sajidan, 2013).

## 2.5 Jagung

Jagung merupakan tanaman semusim yang termasuk kedalam tanaman rumput-rumputan Graminae (Sutarno, 1995). Di Indonesia, jagung merupakan komoditas pangan utama setelah padi yang mempunyai peranan strategis dalam pembangunan pertanian dan perekonomian (Panikkai *et al.*, 2017). Seluruh bagian tanaman jagung memiliki fungsi multiguna (4F), yaitu untuk pangan (*food*), pakan (*feed*), bahan bakar (*fuel*), dan bahan baku industri (*fiber*) (Kementan, 2013). Tanaman jagung dalam tata nama atau sistematika (Taksonomi), diklasifikasi sebagai berikut (Tjitrosoepomo, 1991) :

Regnum : Plantae

Divisi : Spermatophyta

Kelas : Angiospermae

Ordo : Graminae

Famili : Graminaceae

Genus : *Zea*

Spesies : *Zea mays* L.

### 2.4.1 Morfologi Jagung

Tanaman Jagung memiliki sistem perakaran yang menyebar ke segala arah, tetapi pada saat tanaman bertunas, bagian yang tersebar tumbuh ke bawah dan memperkuat pengembangan akar di dasar ruas (Rukmana, 1997). Batangnya ditutupi oleh pelepah daun yang berselang-seling dari setiap bukunya. Pelepah daun terbentuk pada buku dan melilit erat batang, biasanya memanjang hingga ke buku berikutnya (Rubatsky & Yamaguchi, 1998). Batang jagung tidak berlubang seperti batang padi, tetapi padat terisi oleh berkas-berkas pembuluh dan dilindungi jaringan kulit yang tipis dan keras pada bagian terluar batang sehingga tanaman dapat berdiri tegak (AAK, 1993).

Daun jagung tumbuh melekat pada buku-buku batang. Struktur daun jagung terdiri atas tiga bagian, yaitu kelopak daun, lidah daun (ligula), dan helaian daun. Bagian permukaan atas daun berbulu dan terdiri atas sel-sel bulliform, sedangkan permukaan bawah daun umumnya tidak berbulu. Jumlah daun tiap tanaman (pohon) bervariasi antara 8– 48 helai dengan panjang antar 30 cm – 150 cm dan lebar mencapai 15 cm. Letak daun pada batang termasuk daun duduk bersilangan (Rukmana, 1997).

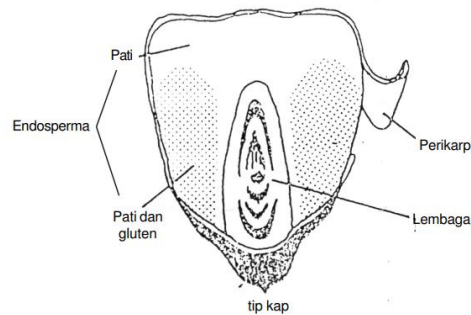
Tanaman jagung memiliki bunga jantan dan bunga betina yang letaknya terpisah. Bunga jantan terdapat pada malai bunga di ujung tanaman, sedangkan bunga betina terdapat pada tongkol jagung. Bunga betina tumbuh dibagian bawah tanaman dalam bentuk bulir majemuk atau sering disebut tongkol yang tertutup rapat oleh upih (kulit ari). Muncul dari tongkol tangkai kepala putik merupakan

rambut atau benang yang terjumbai di ujung tongkol sehingga kepala putiknya menggantung di luar tongkol. Bunga jantan yang terdapat di ujung tanaman masak lebih dahulu daripada bunga betina (Warisno, 1998). Sewaktu reseptif rambut sutra ini lengket, sehingga serbuk sari manapun yang tertiuap kearah rambut ini akan melekat. Setiap rambut dihubungkan oleh tangkai putik yang panjang kebakal buah tunggal yang setelah dibuahi menjadi biji atau inti biji (kernel) (Lovelss, 1989).

Biji jagung menempel erat pada tongkotingol (janggal) dan tersusun rapi memanjang. Biji jagung memiliki bentuk yang berbeda-beda, ada yang bulat tergantung varietasnya. Warna biji kuning, orange dan merah hampir hitam (Tobing *et al.*, 1995).

#### **2.4.2 Biji Jagung**

Biji jagung terletak menempel pada tongkol jagung. Setiap tongkol terdiri atas 10-16 baris biji yang jumlahnya selalu genap. Biji jagung disebut *kariopsis*, dinding *ovari* atau *perikarp* menyatu dengan kulit biji atau *testa*, membentuk dinding buah. Biji jagung terdiri atas tiga bagian utama, yaitu (a) *pericarp*, berupa lapisan luar yang tipis, berfungsi mencegah embrio dari organisme pengganggu dan kehilangan air, (b) *endosperm*, sebagai cadangan makanan, mencapai 75% dari bobot biji yang mengandung 90% pati dan 10% protein, mineral, minyak, dan lainnya dan (c) embrio (lembaga), sebagai miniatur tanaman yang terdiri atas *plamule*, akar *radikal*, *scutelum*, dan *koleoptil* (Rinaldi *et al.*, 2009).



**Gambar 3.1. Struktur biji jagung (Damardjati, 1988)**

Allah SWT menciptakan beranekaragam tanaman dengan berbagai macam bentuk dan memiliki banyak manfaat bagi makhluk hidup lainnya, sebagaimana yang terdapat dalam firman-Nya dalam surat Al-An'am ayat 99, yakni sebagai berikut:

وَهُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ نَبَاتَ كُلِّ شَيْءٍ فَأَخْرَجْنَا مِنْهُ خَضِرًا مِمَّا تُخْرِجُ مِنْهُ حَبًّا مُتَرَاكِبًا وَمِنَ النَّخْلِ مِنْ طَلْعِهَا قِنْوَانٌ دَانِيَةٌ وَجَنَّاتٍ مِنْ أَعْنَابٍ وَالزَّيْتُونَ وَالرُّمَّانَ مُشْتَبِهًا وَغَيْرَ مُنْتَشِبِهِ ۗ أَنْظُرُوا إِلَى ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ ۗ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَاتٍ لِقَوْمٍ يُؤْمِنُونَ

Artinya:

*“Dan Dialah yang menurunkan air hujan dari langit, lalu Kami tumbuhkan dengan air itu segala macam tumbuh-tumbuhan maka Kami keluarkan dari tumbuh-tumbuhan itu tanaman yang menghijau. Kami keluarkan dari tanaman yang menghijau itu butir yang banyak; dan dari mayang korma mengurai tangkai-tangkai yang menjulai, dan kebun-kebun anggur, dan (Kami keluarkan pula) zaitun dan delima yang serupa dan yang tidak serupa. Perhatikanlah buahnya di waktu pohonnya berbuah dan (perhatikan pulalah) kematangannya. Sesungguhnya pada yang demikian itu ada tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi orang-orang yang beriman” (Qs. Al-An'am/06 : 99).*

Berdasarkan Tafsir as-Sa'di / Syaikh Abdurrahman bin Nashir as-Sa'di, pakar tafsir abad 14 H (As-sa'di, 2008), ayat di atas menjelaskan banyaknya nikmat Allah yang patut untuk disyukuri. Malai dari turunnya hujan kemudian

ditumbuhkannya berbagai jenis tanaman yang memiliki aneka ragam bentuk dan manfaat merupakan salah satu bukti kekuasaannya. Kemudian disebutkan pula perincian dari tumbuh tumbuhan yang beraneka ragam itu; di antaranya ialah rerumputan yang tumbuh berumpun-rumpun sehingga kelihatan menghijau. Tumbuh-tumbuhan jenis ini mengeluarkan buah yang berbentuk butiran-butiran kecil yang terhimpun dalam sebuah tangkai seperti gandum, syair dan padi. Jenis yang lain dari tumbuh-tumbuhan itu ialah pohon palma yang mengeluarkan buah yang terhimpun dalam sebuah tandan yang menjulai rendah sehingga mudah dipetik. Hal ini lebih menjelaskan pada kekuasaan-Nya bahwa, “Kami keluarkan darinya yakni tanaman yang hijau itu butir yang saling bertumpuk” yakni banyak, padahal sebelumnya dia hanya satu biji atau benih. Tanaman yang menghijau dan memiliki butir (biji) banyak dalam ayat tersebut dapat dimaksudkan adalah tanaman jagung. Dimana ketika tanaman ini sudah berbuah dan mencapai kematangan sempurna, maka terdapat banyak manfaat yang dapat diambil.

Jagung merupakan sumber karbohidrat, dan kandungan gizi utama jagung adalah pati (72-73%), kadar gula sederhana jagung (glukosa, fruktosa, dan sukrosa) berkisar antara 1-3%, protein jagung (8-11%), jagung juga mengandung asam lemak, vitamin, dan mineral esensial seperti K, Na, P, Ca, Zn, dan Fe. Kandungan mineral Ca biji jagung berkisar antara 20,1-28,7 mg/100 g (Suarni dan Widowati, 2001).

Nilai nutrisi biji jagung berupa protein kasar, karbohidrat, total energi serta bobot biji dipengaruhi oleh umur panen. Kandungan protein kasar cenderung mengalami penurunan dengan penundaan panen hingga matang, sebaliknya

karbohidrat dan bobot biji meningkat seiring dengan penundaan panen hingga saat matang, sementara total energi relatif konstan sejak masak susu awal hingga saat matang, sementara bobot tertinggi dicapai saat biji matang (Fesal, 2013).

#### **2.4.2 Biji Jagung Sebagai Pakan Ternak**

Penggunaan jagung dalam ransum pakan ternak, terutama unggas, jagung merupakan komponen utama dengan proporsi sekitar 60%. Diperkirakan lebih dari 58% kebutuhan jagung dalam negeri digunakan untuk pakan, sedangkan untuk pangan hanya sekitar 30%, dan sisanya untuk kebutuhan industri lainnya dan benih (Kementan, 2013). Permintaan terhadap jagung sebagai bahan baku pakan ternak terus meningkat. Penggunaan jagung untuk pakan didorong oleh harganya yang relatif terjangkau, mengandung kalori tinggi dan protein dengan kandungan asam amino lengkap, dan disukai oleh ternak dibandingkan dengan bahan baku pakan lainnya (Kasryno *et al.*, 2008). Selain itu, jagung mengandung serat kasar rendah yang cocok sebagai pakan ayam dan memiliki kandungan pati yang tinggi (>60%) sehingga memiliki kandungan energi termetabolis (ME) relatif tinggi dibanding bahan pakan lainnya sehingga memenuhi lebih dari separuh energi yang dibutuhkan ayam, baik ayam broiler maupun petelur. Salah satu kelebihan jagung untuk pakan unggas, terutama ayam petelur, adalah kandungan xantofilnya yang tinggi (18 ppm) dan berguna untuk kuning telur, kulit, atau kaki berwarna lebih cerah (Sariubang & Herniwati, 2011).

Jenis jagung yang biasanya digunakan sebagai pakan unggas adalah jagung kristal atau jagung dara yang merupakan jenis jagung lokal madura. Jagung ini

memiliki butiran jagung yang relatif kecil sehingga sangat cocok untuk makanan burung, umur tanam yang pendek, daya simpan lama hingga 2 tahun tanpa perlakuan pasca panen yang mahal dan lebih tahan terhadap hama gudang, memiliki rendemen jagung yang tinggi jika digiling menjadi beras jagung, dan harga benih jagung relatif murah di banding jagung hibrida (Amzeri, 2018). Jagung jenis ini juga memiliki persentase kandungan protein dan lemak tinggi masing-masing sebanyak 11,24% dan 4,96% dibanding jagung hibrida seperti Pioneer 7 (protein 8,22% dan lemak 3,24%), Pioneer 11 (protein 8,70% dan lemak 3,34%), Bisi 2 (protein 9,51 % dan lemak 3,95%) dan Bisi 7 (protein 10,09% dan lemak 3,27%) (Suhardjo & Lestari, 2006). Jagung kristal mudah ditemukan di pasar, hal ini dikarenakan 30% areal jagung di Jawa Timur berada di Pulau Madura dan sebagian besar (>90%) jagung yang dikembangkan di lahan Madura adalah jenis lokal (Amzeri, 2018).

Jagung memiliki peranan yang besar dalam bidang peternakan, upaya mengganti jagung dengan biji-bijian lain tampaknya belum berhasil sehingga jagung tetap menjadi bahan baku utama pakan di dunia (Kasryno *et al.*, 2008). Namun di dalam biji-bijian mengandung senyawa anti-nutrisi yang dapat mengganggu pertumbuhan dan produktivitas ternak, terutama di dalam bagian intinya terdapat sekitar 90% asam fitat dalam bentuk fitin (asam fitat dalam bentuk garam) yang merupakan bentuk penyimpanan fosfor (Kurniati dan Yuanita, 2014). Kandungan fitat pada jagung 80% terdapat di dalam lembaga (*germ*) (Sokrab *et al.*, 2012). Biji jagung juga mengandung enzim fitase namun aktivitas fitase endogennya rendah sehingga tidak cukup digunakan untuk

menghidrolisis asam fitat yang tinggi pada biji jagung, sehingga diperlukan suatu usaha untuk menurunkan kadar asam fitat dalam jagung dengan harapan nilai cerna serta bioavailabilitas mineral dapat meningkat (Kurniati dan Yuanita, 2014).

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **3.1 Rancangan Penelitian**

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini yakni eksplorasi dan eksperimental. Penelitian eksplorasi dilakukan dengan mengisolasi khamir pada biji jagung yang diperoleh dari daerah Pamekasan, Madura. Penelitian eksperimental dilakukan dengan menguji khamir endofit jagung yang kemudian disajikan secara deskriptif kuantitatif dan kualitatif.

Penelitian kuantitatif disajikan berdasarkan indeks hidrolitik, kurva kalibrasi spektrofotometer, dan perhitungan aktivitas fitase. Penelitian deskriptif kualitatif yakni melalui penggambaran khamir secara morfologi makroskopis, mikroskopis dan biokimia. Hasil data kualitatif dan kuantitatif menunjukkan range strain khamir pada biji jagung yang memiliki potensi dalam menghasilkan fitase.

### **3.2 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian dilakukan pada bulan Februari 2022 - Juni 2022. Lokasi pengambilan sampel biji jagung berada di daerah Pamekasan, Madura. Isolasi khamir dan Uji enzim Fitase bertempat di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Fisiologi Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

### **3.3 Alat dan Bahan**

#### **3.3.1 Alat Penelitian**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah jarum ose, batang pengaduk segitiga, oven, autoklaf, rotary shaker, api bunsen, pipet, cutter, mikro pipet, pinset, cawan petri, erlenmeyer, gelas beker, gelas ukur, *Laminar Air Flow* (LAF), *hot plate*, *stirrer*, tabung reaksi, *vortex*, timbangan analitik, spatula, *mikrotube*, *pH meter*, inkubator bergoyang, inkubator, lemari pendingin, spektrofotometer, mikroskop, tabung durham, kertas lakmus, tabung endorf 50 mL, *object glass*, *deckglass*, kamera, *blue tip*, *yellow tip*, plastik wrab, dan sentrifugase.

#### **3.3.2 Bahan Penelitian**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji jagung, alkohol 70%, yeast extract, malt extract, pepton, glukosa, microbial agar, sodium DL-lactat, akuades,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , KCl,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ , Ca-fitat (Puritan's Pride),  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , kalium antimonil, ammonium molibdat, asam askorbat,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , NaCl, laktosa, sukrosa, *acid fuchsin*, dan NaOH.

### **3.4 Prosedur Penelitian**

#### **3.4.1 Pembuatan Media**

##### **3.4.1.1 Media YMEA (Yeast Malt Extract Agar)**

Pembuatan media YMEA dibuat dengan mengikuti James *et al.* (1996). Komposisi yang digunakan terdiri dari *yeast extract* 3 gram, *malt extract* 3 gram,

pepton 5 gram, glukosa 10 gram dan *microbial agar* 20 gram dalam 1 liter aquades. Media dibuat dalam tabung Erlenmeyer kemudian dihomogenkan menggunakan *stirrer* dan dipanaskan pada *hot plate*. Media yang telah homogen selanjutnya disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C dan tekanan 2 atm selama 15 menit. YMEA yang telah disterilisasi didiamkan hingga 50<sup>0</sup>C kemudian ditambahkan dengan *Sodium DL-Lactat* sebanyak 120 µL sebagai antibakteri (Biomedical Engineering, 2015). Media dituang pada setiap cawan petri sebanyak 20 ml. Media agar didiamkan dan ditunggu hingga memadat kemudian disimpan di lemari pendingin untuk digunakan inokulasi selanjutnya.

#### **3.4.1.2 Media YMB (Yeast Malt Broth)**

Media YMB dibuat berdasarkan Kurtzman dan Fell (1998). Komposisi yang digunakan yaitu 3 gram *yeast extract*, 3 gram *malt extract*, 5 gram pepton, 10 gram glukosa dilarutkan ke dalam 1000 ml aquades. Larutan tersebut dimasukkan ke dalam erlenmeyer kemudian dihomogenkan menggunakan *hotplate stirrer*. Media yang telah homogen selanjutnya disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C dan tekanan 2 atm selama 15 menit. YMB telah steril didiamkan hingga suhu mencapai 50<sup>0</sup>C kemudian ditambahkan dengan *Sodium DL-Lactat* sebanyak 120 µL sebagai antibakteri (Biomedical Engineering, 2015).

#### **3.4.1.3 Media Selektif Agar PSMA (Phytase Selective Medium Agar)**

Media PSMA dibuat berdasarkan referensi metode Ogunremi *et al.* (2020) yakni dengan membuat media sebanyak 1000ml maka dilakukan penimbangan

dan mencampurkan 15 gram glukosa, 5 gram  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0,5 gram KCl, 0,5 gram  $\text{MgSO}_4$ , 0,01 gram  $\text{FeSO}_4$ , 0,01 gram  $\text{MnSO}_4$ , 2 g  $\text{CaCl}_2$ , dan 5 gram Ca-fitat dalam beker glass yang berisi 1000 ml akuades. Selanjutnya, dihomogenkan menggunakan *hot plate magnetic stirrer* sampai semua bahan larut, selanjutnya pH media diatur menjadi pH 5. Kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu  $121^\circ\text{C}$  pada tekanan 2 atm selama 15 menit. Tambahkan 20 gram *microbial agar* untuk pembuatan media fitase padat.

#### **3.4.1.4 Media Selektif PSMB (Phytase Selective Medium Broth)**

Media PSMB dibuat berdasarkan referensi metode Ogunremi *et al.* (2020) yakni dengan membuat media sebanyak 1000 ml maka dilakukan penimbangan dan mencampurkan 15 gram glukosa, 5 gram  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0,5 gram KCl, 0,5 gram  $\text{MgSO}_4$ , 0,01 gram  $\text{FeSO}_4$ , 0,01 gram  $\text{MnSO}_4$ , 2 g  $\text{CaCl}_2$ , dan 5 gram Ca-fitat dalam gelas beker yang berisi 1000 ml akuades. Selanjutnya, dihomogenkan menggunakan *hot plate magnetic stirrer* sampai semua bahan larut, selanjutnya pH media diatur menjadi pH 5. Kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu  $121^\circ\text{C}$  pada tekanan 2 atm selama 15 menit.

#### **3.4.1.5 Media Fermentasi Karbohidrat**

Media fermentasi karbohidrat dibuat dengan acuan buku Atlas tahun 2005. Pembuatan 1000 ml media fermentasi karbohidrat membutuhkan 10 gram peptone, 5 gram NaCl, 3 gram *meat extract*, 10 ml *Andrade's indicator* dan 50 ml *carbohidrat solution*. Pembuatan *Andrade's indicator* dan *carbohidrat solution*

dilakukan secara terpisah. Pembuatan media fermentasi dilakukan dengan mengencerkan bahan tersebut selain *carbohidrat solution* dengan aquades hingga angka 950 ml. Setelah homogen kemudian media fermentasi yang berada pada erlenmeyer dimasak dengan air mendidih sampai media fermentasi berubah warna menjadi merah.

Pembuatan 100 ml *Andrade's indicator* dilakukan dengan mencampur *acid fuchsin* 0,1 gram dan NaOH (1 N Solution) 16 ml yang kemudian dilarutkan dengan aquades hingga angka 100 ml. Pembuatan 100 ml *carbohidrat solution* dilakukan dengan mengencerkan 10 gr gula (jenis gula yang diinginkan sebagai sumber karbohidrat pada uji fermentasi) dengan aquades hingga angka 100 ml kemudian disterilisasi dengan *autoklaf*. Jenis gula yang digunakan pada penelitian ini adalah fruktosa, glukosa, dan sukrosa.

Media fermentasi karbohidrat yang telah berwarna merah kemudian dimasukkan sebanyak 9,5 ml pada tabung reaksi yang telah diletakkan tabung durham didalamnya. Kemudian dipastikan media fermentasi juga masuk memenuhi tabung durham dengan cara mengocok tabung reaksi secara perlahan. Tabung reaksi kemudian ditutup dan dilakukan proses sterilisasi dengan autoklaf. Setelah media dingin kemudian ditambahkan 0,5 ml *carbohidrat solution* steril pada setiap tabung.

#### **3.4.1.6 Media Pikovskaya broth**

Pembuatan media *Pikovskaya Broth* dilakukan dengan menimbang bahan sebagai berikut  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$  5 gram, glukosa 13 gram,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.5 gram,

NaCl 0.2 gram,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.0002 gram  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 gram, *ekstrak yeast* 0.5 gram, KCl 0.2 gram,  $\text{MnSO}_4$  0.0002 gram. Semua bahan dilarutkan dalam aquades sebanyak 1000 ml. Bahan dimasukkan secara bertahap dalam *beaker glass* berisi aquades 1000 ml. Campuran bahan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer*. Media diukur derajat keasaman menggunakan *pH meter* sampai nilai 7,2 dan dibagi kedalam setiap tabung reaksi sebanyak 10 ml (Pikovskaya, 1948; Promwee *et al.*, 2014)

### **3.5 Langkah Kerja**

#### **3.5.1 Sterilisasi Alat dan Bahan**

Sterilisasi dilakukan dengan membungkus cawan petri menggunakan kertas bekas tanpa coretan/tinta. Kemudian dimasukkan ke dalam plastik tahan suhu panas dan diikat kuat dengan karet gelang. Sterilisasi media YMEA dan YMB dilakukan dengan menutup rapat mulut labu erlenmeyer dengan plastik wrab.

Alat dan bahan disterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan suhu  $121^\circ\text{C}$  tekanan 1 atm. Setelah autoklaf berbunyi, ditunggu hingga suhu serta tekanan autoklaf kembali ke pengaturan awal. Langkah selanjutnya, media dikeluarkan dari autoklaf setelah suhu media menurun sehingga tidak terlalu panas. Selanjutnya media disimpan ke dalam kulkas media atau dituang ke dalam cawan petri.

### 3.5.2 Isolasi Khamir dari Biji Jagung

Isolasi khamir dilakukan dengan beberapa tahapan, diantaranya sterilisasi permukaan biji jagung berdasarkan metode Marlida *et al.* (2010) yakni dengan merendam biji jagung menggunakan alkohol 70% selama 1 menit, kemudian direndam dalam larutan Sodium hypochlorite 3% selama 4 menit. Setelah itu sampel direndam kembali dengan alkohol 70% selama 30 detik dan dibilas 3 kali menggunakan aquades steril selama 1 menit pada masing-masing bilasan, kemudian sampel dikeringkan dengan tisu. Semua tahapan isolasi dilakukan secara aseptis di dalam LAF (*Laminar Air Flow*).

Tahapan selanjutnya yakni memotong biji jagung secara vertikal menjadi dua menggunakan pisau steril. Sampel kemudian dimasukkan ke dalam tabung ependof 50 ml dan ditambahkan media cair YMB yang telah ditambahkan *Sodium DL-Lactate* (Watanabe *et al.*, 2016). Selanjutnya sampel diinkubasi selama 3 hari pada suhu ruang hingga membentuk adanya gelembung. Gelembung berisi udara tersebut menurut Kurtzman & Fell (1998) menandakan adanya proses fermentasi di dalam media, sehingga dapat digunakan sebagai acuan pertumbuhan dan perkembangan khamir. Selanjutnya proses pengenceran pada khamir yang telah terindikasi tumbuh pada media.

Tahap pengenceran isolat dilakukan dengan mengambil 1 ml larutan sampel dari media YMB kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml akuades steril dan dilakukan pengenceran hingga  $10^{-3}$ . Menurut Rashid *et al.* (2013), pengenceran dilakukan sampai  $10^{-3}$  dan dilanjutkan dengan inokulasi khamir pada media YMEA dengan mengambil 200 ul dari pengenceran  $10^{-3}$

tersebut. Metode inokulasi menggunakan metode *spread plate* dan diinkubasi pada suhu ruang (27°C) selama 48 jam (Suryaningsih *et al*, 2018). Pertumbuhan khamir selanjutnya diamati dan dilakukan subkultur sampai mendapatkan koloni khamir murni.

### **3.5.3 Purifikasi Khamir**

Pemurnian khamir hasil isolasi disebut dengan purifikasi. Purifikasi khamir dilakukan dengan cara memilih koloni yang terlihat berbeda dengan koloni yang lain dari segi morfologi dan tumbuh secara dominan pada media (Widiastutuik & Nur, 2014). Koloni yang terpilih kemudian dilakukan *streak plate* pada media YMEA miring (Cyriacus & Kingsley, 2010). Hal ini bertujuan untuk memperoleh isolat murni khamir dengan memilih koloni yang tumbuh secara dominan dan memiliki perbedaan dalam karakteristik morfologi antar koloni (Widiastutuik & Nur, 2014).

### **3.5.4 Uji Enzim Fitase**

#### **3.5.4.1 Skrining Khamir Penghasil Fitase**

Satu isolat tunggal diambil dari media YMEA dengan tusuk gigi steril dan diinokulasikan membentuk bulatan rapi ke dalam cawan petri steril berisi media padat PSMA (*Phytase Selective Medium Agar*). Isolat kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 3 hari hingga membentuk zona bening pada media. Zona bening yang terbentuk pada media kemudian diukur menggunakan bantuan alat

jangka sorong. Tiga isolat khamir penghasil fitase tertinggi dipilih berdasarkan Zona hidrolitik terbesar berdasarkan rumus (Mittal *et al.* 2011):

$$\text{Zona Hidrolitik (mm)} = \text{Diameter Zona Bening (mm)} - \text{Diameter Isolasi (mm)}$$

### 3.5.4.2 Uji Aktivitas Fitase

#### 3.5.4.2.1 Ekstraksi Enzim Fitase

Ekstraksi enzim fitase dilakukan dengan mengambil koloni tunggal dari tiga isolat khamir dengan zona hidrolitik tertinggi menggunakan ujung tip steril yang dibantu dengan mikropipet. Selanjutnya isolat dimasukkan ke dalam 15 mL PSMB pada tabung reaksi 50 mL dan diinkubasi pada inkubator bergoyang bersuhu 30°C dengan kecepatan 200 rpm selama 72 jam (Ramadhan, 2016; Nuobariene *et al.* 2011). Selanjutnya, untuk mendapatkan ekstrak kasar enzim, isolat yang telah diinkubasi diambil sebanyak 1 ml dan dipindahkan ke tabung Eppendorf 1,5 ml dan disentrifus dengan kecepatan 8000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C (Saribuga *et al.*, 2014).

#### 3.5.4.2.2 Uji Spektrofotometri

Pengujian aktivitas fitase dilakukan dengan mengikuti Nakamura *et al.* (2000) yakni dengan memasukkan 50 µL enzim kasar ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 50 µL asam fitat 0.5% (b/v) dalam buffer asam asetat 100 mM (0.1 M, pH 5). Sampel kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 30 menit. Setelah 30 menit, reaksi dihentikan dengan penambahan TCA 15% (*trichloroacetic acid*) sebanyak 100 µL (Mittal *et al.*, 2011). Sampel kemudian ditambahkan 160 µL

larutan fosfat molibdat dan diinkubasi lagi pada suhu 30°C selama 1 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan larutan berubah warna menjadi biru (Syamsia *et al.*, 2015). Setelah muncul warna biru, kedua campuran tersebut dianalisis menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) 700 nm.

Perlakuan selanjutnya yakni membandingkan absorbansi yang didapatkan dari pengukuran sampel dengan standar fosfat. Perhitungan konsentrasi fosfat didasarkan pada pembacaan kurva standar fosfat dengan satuan ppm. Kurva standar menggunakan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  dengan konsentrasi 0; 10; 20; 30; 45 dan 50 ppm. Data hasil pembacaan spektrofotometer akan diolah dengan menggunakan rumus persamaan linier  $y = ax + b$  untuk menentukan konsentrasi fosfat terlarut. Sampel diukur serapan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan  $\lambda = 700$  nm dan diukur aktivitas fitasenya dengan rumus (APHA, 1976):

$$\text{Aktivitas Fitase (U/mL)} = \frac{C \times \text{FP} \times 1000}{t \times \text{BM} \times \text{Volume enzim}}$$

Keterangan: C = Konsentrasi (mg/mL)

FP = Faktor Pengenceran

t = Waktu Reaksi (menit)

### **3.5.5 Pengamatan Morfologi Khamir**

#### **3.5.5.1 Pengamatan Makroskopik**

Pengamatan morfologi khamir secara makroskopik dilakukan pada isolat hasil purifikasi berumur 72 jam. Pengamatan morfologi koloni dilakukan dengan menginokulasikan isolat yeast ke larutan NaCl Fis 0,85% dengan perbandingan

1:9 atau sebanyak 100  $\mu$ l isolat ke dalam 900  $\mu$ l NaCl. Pengenceran dilakukan dengan cara menginokulasikan 900  $\mu$ l larutan NaCl Fis 0,85% dan 100  $\mu$ l isolat ke dalam *microtube* kemudian dihomogenkan dengan *vortex*. Selanjutnya, diambil 100  $\mu$ l sampel dari pengenceran pertama kemudian diencerkan kedalam 900  $\mu$ l NaCl. Pengenceran dilakukan sebanyak 4 kali pengenceran sehingga didapat angka urutan pengenceran  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ . Diambil 100 $\mu$ l dari 2 suspensi pengenceran terakhir ( $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ) dan diinokulasikan pada cawan petri steril yang kemudian di *spread*. Pengamatan morfologi koloni dilakukan dengan mengamati bentuk, tekstur, warna, permukaan, elevasi dan tepi koloni (Widiastutik & Nur, 2014; Zunaidah & Alami, 2014; Suryaningsih, 2018) dengan menggunakan acuan buku *The Yeast: A Taxonomy Study* (Kurtzman & Fell, 1998).

#### **3.5.5.2 Pengamatan Mikroskopik**

Pengamatan morfologi khamir secara mikroskopis dilakukan dengan membuat preparate basah, yakni dengan meletakkan isolat khamir hasil purifikasi 3x24 jam pada *deck glass*, kemudian ditetesi akuades steril (Ma'aruf *et al.*, 2011). Langkah selanjutnya yakni dilakukan pengamatan dibawah mikroskop dengan perbesaran 4x10 sampai 100x10 dengan mengamati ukuran khamir, *budding* dan bentuk sel (Suryaningsih, 2018). Hasil pengamatan mengacu referensi buku *The Yeast: A Taxonomy Study* Kurtzman & Fell (1998).

### **3.5.6 Pengamatan Secara Biokimia**

#### **3.5.6.1 Uji Fermentasi Karbohidrat**

Uji fermentasi karbohidrat dilakukan untuk mengetahui kemampuan khamir dalam memfermentasi karbohidrat. Sumber karbohidrat yang digunakan dalam penelitian ini adalah fruktosa, glukosa, dan sukrosa dengan prosedur penelitian yang mengacu pada buku Harley & Prescott (2002) dengan sedikit modifikasi dari Atlasa (2005). Khamir yang diinokulasikan pada media fermentasi karbohidrat adalah khamir berumur 48 jam sebanyak 100 µl. Media fermentasi karbohidrat juga ditambahkan indikator pH dan tabung durham. Pengujian dilakukan sebanyak dua pengulangan (*duplo*). Isolat selanjutnya diinkubasi selama 7 – 14 hari pada suhu ruang dan diamati perubahannya.

Uji fermentasi akan menunjukkan hasil positif apabila warna merah medium fermentasi berubah menjadi kekuningan yang mengindikasikan khamir telah menghasilkan asam sehingga merubah pH media menjadi asam. Sedangkan tetapnya warna merah media disertai adanya gelembung menunjukkan adanya reaksi fermentasi karbohidrat menjadi etanol. Penggunaan tabung durham untuk menangkap gelembung-gelembung udara sebagai hasil dari proses fermentasi (Harley & Prescott, 2002).

#### **3.5.6.2 Uji Fosfat**

Uji fosfat dilakukan untuk mengetahui kemampuan khamir dalam melarutkan fosfat dengan dua media yang berbeda yakni media PSMB dan media *Pikovskaya broth*. Pengujian dilakukan berdasarkan Nuobariene *et al.* (2011)

dengan modifikasi yakni dengan mengambil koloni tunggal dari tiga isolat khamir dengan zona hidrolitik tertinggi menggunakan ujung tip steril yang dibantu dengan mikropipet. Selanjutnya isolat dimasukkan ke dalam 15 mL media PSMB pada tabung reaksi 50 mL dan diinkubasi pada inkubator bergoyang bersuhu 28°C dengan kecepatan 200 rpm selama 7 hari. Isolat kemudian dimasukkan kedalam tabung Eppendorf dan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatant diambil sebanyak 0,4 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Pereaksi warna fosfat molibdat ditambahkan dalam tabung (0,16 mL sodium molibdat 2.5%, 0,04 mL asam sulfat 10 N dan 0,1 ml hidrazin sulfat 0,5 M, 2,3 mL akuades steril non fosfat) (Lampiran 2). Supernatan isolat yang ditambah dengan pereaksi warna fosfat molibdat didiamkan selama 10 - 35 menit. Hasil positif ditunjukkan dengan larutan berubah warna menjadi biru (Syamsia *et al.*, 2015). Langkah penelitian yang sama juga dilakukan pada uji fosfat media *Pikovskaya broth*.

## **BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **4.1 Uji Enzim Fitase**

#### **4.1.1 Isolasi dan Skrining Khamir Potensial Penghasil Fitase dari Biji Jagung**

Berdasarkan hasil isolasi khamir dari biji jagung (*Zea mays*), diperoleh lima jenis isolat khamir dengan karakteristik morfologi koloni yang berbeda, isolat – isolat tersebut diberi kode isolat YFJ-1, YFJ-2, YFJ-3, YFJ-4 dan YFJ-5 (Tabel 4.1). Isolat khamir tersebut merupakan hasil dari inokulasi dan pemurnian pada media agar YMEA (*Yeast Malt Ekstract Agar*) pada suhu 27°C. Pemurnian dilakukan dengan mengisolasi koloni yang terpisah pada media yang sama sebanyak dua kali ulangan (Kanti & Latupapua, 2001). Dua kali pemisahan koloni dilakukan untuk memperoleh isolat dengan tingkat kemurnian yang tinggi (Lasmini, 2016 & Suryaningsih, 2018).

Pengamatan morfologi karakteristik khamir secara makroskopis pada isolat khamir meliputi tepi, elevasi, warna, permukaan, tekstur dan bentuk. Isolat khamir yang diamati yaitu koloni yang tidak berlendir, tumbuh terpisah, dan berwarna (Simbolon, 2018). Pelczar (1998), menyatakan ciri khamir lainnya yaitu terdapat spora, tidak mengkilat, dan berwarna putih kekuningan atau putih susu. Simbolon (2018), menambahkan bahwa khamir dapat diamati berdasarkan bau yang dihasilkan isolat tersebut seperti tape (alkohol).

**Tabel 4.1. Karakteristik morfologi khamir hasil isolasi biji jagung (*Zea mays*)**

Kode Isolat	Morfologi Koloni					
	Bentuk	Tekstur	Warna	Permukaan	Elevasi	Tepi
YFJ-1	Bulat	Kental seperti mentega	Putih krem	Berkilau	Timbul	Tidak rata
YFJ-2	Bulat	Kental seperti mentega	Putih krem	Kusam	Timbul	Rata
YFJ-3	Bulat	Berlendir	Putih krem	Berkilau	Timbul	Rata
YFJ-4	Bulat	Kental seperti mentega	Putih bersih	Kusam	Timbul	Rata
YFJ-5	Bulat	Kental seperti mentega	Putih krem	Kusam	Rata	Rata

Khamir memiliki habitat hidup hampir di semua tempat yaitu di wilayah akuatik, daratan, dan udara (Starmer & Lachance 2011). Khamir juga memiliki habitat di dalam tumbuhan, diantaranya di dalam biji, batang, daun, bunga, dan buah. Menurut Walker (2009), khamir lebih menyukai jaringan tanaman sebagai habitatnya. Khamir ini umumnya dikenal sebagai khamir endofit. Khamir endofit secara umum merupakan khamir yang berasosiasi didalam jaringan tumbuhan seperti pada bunga, buah, daun, ranting bahkan akar tumbuhan (Worang, 2003).

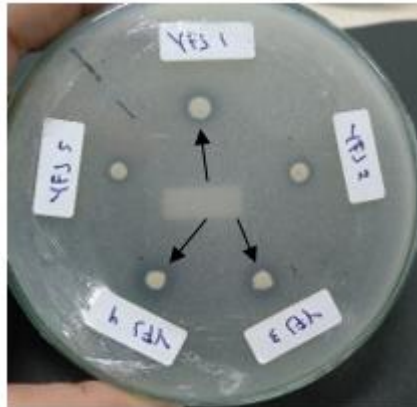
Lima isolat khamir dengan kode YFJ-1, YFJ-2, YFJ-3, YFJ-4 dan YFJ-5 yang telah didapatkan dari proses isolasi biji jagung di uji lanjut untuk mengetahui ada tidaknya potensi khamir yang diperoleh dalam menghasilkan enzim fitase, uji lanjutan ini yakni uji skrining fitase. Uji skrining juga dilakukan untuk menyeleksi tiga isolat penghasil fitase paling banyak di antara lima isolat khamir dari biji

jagung yang nantinya ketiga isolat khamir tersebut yang akan digunakan sebagai uji lanjutan.

Uji enzim fitase dilakukan menggunakan dua macam media selektif, diantaranya media selektif padat / PSMA (*Phytase Selective Medium Agar*) dan media selektif cair / PSMB (*Phytase Selective Medium Broth*). Media selektif padat digunakan untuk uji skrining khamir potensial penghasil fitase, sedangkan media cair digunakan dalam proses ekstraksi enzim fitase dari isolat khamir (Ogunremi *et al.*, 2020). Media selektif fitase sendiri merupakan media khusus yang mengandung substrat fitase didalamnya. Uji enzim fitase pada penelitian ini menggunakan Ca-fitat sebagai sumber substrat. Menurut Lim *et al* (2007) adanya ikatan fitat dengan kalsium (Ca) akan membentuk penghubung yang mendekatkan fitase dengan substrat sehingga meningkatkan aktivitas katalik fitase. Dapat digunakan sebagai tambahan pada pakan ternak dan bermanfaat pada pertumbuhan tanaman yang hidup pada kondisi fosfat terbatas.

Media skrining fitase memiliki penampakan agar berwarna putih keruh (Mittal *et al.* 2011). Khamir yang memiliki kemampuan dalam mendegradasi asam fitat akan merubah warna media fitase dari putih keruh menjadi jernih, wilayah jernih inilah yang disebut sebagai zona bening. Zona bening merupakan wilayah jernih yang terbentuk di sekeliling koloni yang menandai adanya reaksi hidrolisis asam fitat menjadi fosfor oleh fitase ekstarseluler (Delvita, 2011; Selle *et al.*, 2006). Fosfor yang dihasilkan dari proses penguraian asam fitat berdifusi ke dalam medium sehingga kekeruhan di sekeliling koloni hilang seperti yang terlihat pada gambar 4.1. Zona bening yang terbentuk pada media akan

menghasilkan indeks zona hidrolitik. Indeks zona hidrolitik terbentuk dari perhitungan total diameter zona bening pada media tumbuh dikurangi diameter koloni (Mittal *et al.* 2011).



**Gambar 4.1. Zona bening yang terbentuk dari isolat khamir asal biji jagung (*Zea mays*) pada media selektif PSMA**

Berdasarkan hasil skrining khamir, kelima isolat khamir yang diperoleh dari jagung memiliki kemampuan dalam menghidrolisis asam fitat. Kelima khamir tersebut zona bening pada media PSMA dan membentuk zona hidrolitik. Isolat-isolat dengan urutan penghasil zona hidrolitik tertinggi diperoleh oleh isolat dengan kode YFJ-4, YFJ-3, YFJ-1, YFJ-2, dan YFJ-5 dengan masing-masing isolat memiliki indeks zona hidrolitik sebanyak 3,69 mm; 3,36 mm; 3,26 mm; 2,10 mm; dan 1.81 mm (tabel 4.2). Pengukuran diameter zona bening dan diameter koloni dilakukan menggunakan bantuan jangka sorong.

**Tabel 4.2. Zona bening yang dihasilkan dari isolat khamir asal biji jagung**

No	Kode Isolat	Diameter Koloni (mm)	Diameter Zona Bening (mm)	Zona Hidrolitik (mm)
1	YFJ-1	4,33	7,58	3,26
2	YFJ -2	3,86	5,96	2,10
3	YFJ -3	3,88	7,24	3,36
4	YFJ -4	3,94	7,63	3,69
5	YFJ -5	3,52	5,33	1,81

Uji enzim fitase pada penelitian ini menggunakan Ca-fitat sebagai substrat dengan kondisi pH 5.0 pada medium. Berdasarkan penelitian Simell *et al.*, (1989), penambahan fitase asal tumbuhan kedalam ransum mampu menurunkan kekuatan fitat yang terdapat dalam saluran pencernaan bagian atas (tembolok) pada kondisi pH 5.0. Menurut Konietzyn & Greiner (2002), pH optimum fitase yang bersifat asam (*acid phytase*) yakni berkisar pada pH 5. Dalam saluran pencernaan ayam, mikroba terdapat hampir di sepanjang usus. Mikroorganisme utama yang terdapat dalam tembolok, usus halus dan ceca adalah golongan bakteri Lactobacilli yang khusus menghasilkan asam laktat dan asam asetat. Sehingga pH dalam tembolok ayam yang baik antara pH 4 – 5 akibatnya organisme yang tidak tahan asam tidak dapat berkembang secara normal (Sjofjan, 2003). Menurut Lim *et al* (2007) kelompok enzim fitase *Histidin Acid Phosphatase* (HAP) tetap mempunyai aktivitas dalam kondisi asam. Fitase ini terdapat pada hewan, tumbuhan maupun mikroorganisme dan banyak digunakan dalam hidrolisis asam fitat pada sereal dan biji-bijian untuk pakan ternak.

Penelitian ini dilakukan di dalam ruangan Laboratorium Mikrobiologi dengan proses inkubasi khamir berada dalam inkubator suhu 30°C, tanpa cahaya.

Khamir tidak memerlukan cahaya untuk tumbuh dan berkembang, hal ini dikarenakan khamir merupakan organisme *chemoorganotroph* yang menggunakan senyawa organik sebagai sumber energi dan tidak membutuhkan cahaya matahari untuk proses pertumbuhannya (Jindamorakot *et al.*, 2009). Sumber energi yang dibutuhkan khamir telah tersedia pada media pertumbuhan.

Komposisi media selektif menggunakan glukosa sebagai sumber karbon dan ammonium sulfat sebagai sumber nitrogen. Sumber karbon berperan sebagai sumber energi utama yang mendukung pertumbuhan mikroba. Sumber karbon umumnya merupakan jenis gula sederhana yang mudah dimetabolisme (Santos, 2011). Menurut Poedjiaji (1994) Glukosa termasuk golongan monosakarida yaitu karbohidrat sederhana yang molekulnya hanya terdiri satu sakarida atau beberapa atom karbon saja dan tidak dapat diuraikan dengan cara menghidrolis dalam kondisi lunak menjadi karbohidrat lain. Pendapat tersebut juga di dukung pernyataan Hassouni *et al*, (2006) yang menyebutkan bahwasanya glukosa dimanfaatkan langsung oleh mikroorganisme tanpa harus dihidrolisis terlebih dahulu atau diurai. Hal ini mendukung digunakannya glukosa sebagai sumber karbon pada media selektif fitase.

Nitrogen memiliki peranan yang penting pada media tumbuh mikroba. Persediaan nitrogen yang cukup mampu mempercepat pertumbuhan mikroba pada fase awal dan akhir pertumbuhan, selain itu sumber nitrogen memiliki peranan penting untuk produksi enzim skala besar (Santos, 2011). Menurut Ramachandran *et al.* (2005), ammonium sulfat mampu memberikan pengaruh positif pada hasil akhir fitase dari *Rhizopus* spp. pada *solid state fermentation*. Selain itu, amonium

sulfat juga telah banyak digunakan di beberapa penelitian sebagai sumber nitrogen untuk produksi fitase (Lambrechts *et al* 1992; Nampoothiri *et al.* 2004; Soni & Khire 2007; dan Singh *et al.* 2013). Penambahan agar pada komposisi media hanya berfungsi sebagai pematat. Menurut Ashshoffa dan yuliani (2019), Agar merupakan bahan yang berfungsi sebagai pematat media, bukan termasuk nutrisi atau zat pengatur tumbuh.

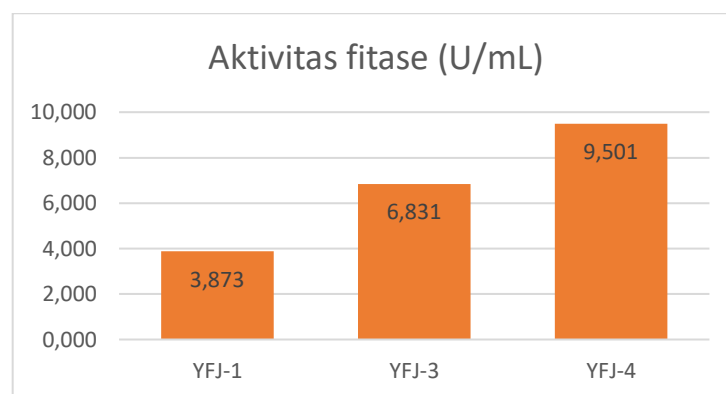
#### **4.1.2 Uji Aktivitas Fitase**

Isolat khamir yang digunakan sebagai uji lanjutan adalah tiga isolat khamir yang memiliki aktivitas hidrolisis asam fitat tertinggi yang ditandai dengan besarnya zona bening yang terbentuk pada media agar selektif fitase (PSMA). Berdasarkan data yang diperoleh dari hasil skrining khamir asal biji jagung, isolat dengan kode YFJ-1, YFJ-3, dan YFJ-4 merupakan isolat dengan zona hidrolitik terbesar (Tabel 4.2).

Ekstraksi enzim kasar fitase dari isolat yang terpilih diperlukan sebelum uji aktivitas fitase dilakukan. Isolat YFJ-1, YFJ-3, dan YFJ-4 yang terpilih diambil sebanyak satu ose dan diinokulasikan ke media PSMB. Isolat di rotary shaker pada kecepatan 200 rpm di dalam inkubator dengan suhu 30°C selama 72 jam. Hasil inkubasi kemudian disentrifuse untuk memisahkan biomassa dengan senyawa produk yang dihasilkan sehingga terbentuk endapan pada tabung Eppendorf. Menurut Pratiwi (2008) sentrifugasi adalah teknik pemisahan suatu bahan berdasarkan berat molekul dengan kecepatan tertentu. Proses sentrifugasi pada penelitian ini dilakukan pada kecepatan 8000 rpm selama 10 menit.

Supernatan hasil sentrifuse di ambil dan digunakan sebagai enzim kasar fitase yang selanjutnya akan digunakan pada uji aktivitas fitase (Saribuga *et al.* 2014).

Uji aktivitas fitase dilakukan menggunakan instrumen spektrofotometri. Larutan fosfat  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  merupakan larutan standar uji pada penelitian ini. Konsentrasi Fosfat yang digunakan sebagai kurva standar yakni 0; 10; 20; 30; 45 dan 50 ppm yang di absorbansi pada gelombang 700 nm dan menghasilkan rata-rata absorbansi secara berturut-turut sebesar 0,000; 0,145; 0,323; 0,459; 0,749 dan 0,800 ppm. Hasil absorbansi larutan standar menghasilkan persamaan garis kurva  $y = 0,0164x - 0,0099$  yang nantinya digunakan sebagai perhitungan aktivitas fitase (Lampiran 3).



**Gambar 4.2. Aktivitas fitase yang dihasilkan isolat khamir dari biji jagung**

Hasil uji spektrofotometri menunjukkan bahwasanya isolat dengan kode YFJ-4 memiliki aktivitas enzim fitase tertinggi dibandingkan isolat YFJ-1 dan YFJ-3, yakni sekitar 0,144 U/mL hingga 9,501 U/mL. Menurut (Delfita, 2011), aktivitas enzim dinyatakan dalam bentuk unit/mL yang berarti  $\mu\text{mol PO}_4^{-3}$  yang dilepas per menit per mililiter enzim. Artinya dalam satu mililiter isolat YFJ-4

mampu melepaskan 0,144 hingga 9,501  $\mu\text{mol}$  fosfat dalam satu menit. Isolat YFJ-3 memiliki aktivitas fitase tertinggi kedua dengan menghasilkan aktivitas fitase sebesar 0,117 U/mL hingga 6,831 U/mL, sedangkan isolat YFJ-1 memiliki aktivitas fitase sebesar 0,093 U/mL hingga 3,873 U/mL (Gambar 4.2).

Berdasarkan hasil uji aktivitas fitase, khamir memiliki kemampuan yang berbeda-beda dalam menghidrolisis asam fitat. Perbedaan aktivitas yang dihasilkan oleh fungi endofit tergantung pada kemampuan fungi tersebut untuk menggunakan asam fitat sebagai substrat dan menghasilkan fitase (Khrisna 2005). Hasil statistik menunjukkan bahwa setiap isolat berbeda nyata ( $P < 0,05$ ) (Lampiran 2).

Fitase yang dihasilkan oleh isolat khamir asal jagung memiliki hubungan yang erat dengan fisiologi biji jagung. Biji jagung mengandung fitat yang sejatinya berperan dalam fungsi fisiologis (penyimpanan fosfor dan kation) khususnya selama dormansi dan perkecambahan pada biji serta melindungi kerusakan oksidatif pada biji selama proses penyimpanan (Trudy, 1999). Asam fitat tersebut berfungsi sebagai cadangan unsur P (fosfor) sehingga P yang terikat pada asam fitat jumlahnya mencapai 60% dari total P biji (Hitz *et al.*, 2002). Unsur P yang terikat pada asam fitat di dalam biji akan dihidrolisis oleh *fitase* sehingga P terbebas dan dapat digunakan untuk proses perkecambahan (Miswar, 2007). Tan & Zou, 2001 menyatakan bahwa kemampuan mikroorganisme endofitik dalam menghasilkan metabolit sekunder (enzim) sesuai dengan fisiologi tanaman inangnya. Sintesis fitase oleh isolat merupakan respon dari adanya

perubahan kebutuhan fisiologi (Trudy, 1999) dan ditentukan oleh gen yang terdapat di dalam kromosom (Rhodes & Fletcher, 1966).

Asam fitat atau *myo-inositol hexakisphosphate* merupakan bentuk utama penyimpanan unsur fosfor yang terdapat pada biji-bijian, sereal, legum, dan *oilseed* (Kerovuo *et al.*, 2000). Tanaman sereal, legume, dan *oilseeds* tersebut antaral lain biji jagung (*Zea mays*), padi (*Oryza sativa*) (O'Dell *et al.*, 1972), kedelai (*Glycine max* L) (Raboy and Disckinson, 1993), kacang tanah (*Arachis hypogaea*) (Panhwar, 2005), batley (*Hordeum vulgare*), gandum (*Triticum aestivum*), dan buncis (*Phaseolus vulgaris*) (Reddy *et al.*, 1982).

Pemanfaatan biji jagung sebagai komponen utama ransum ternak, khususnya non-ruminansia menyebabkan unsur P yang terikat pada asam fitat tidak dapat diserap pencernaan ternak. Selain unsur P, asam fitat juga mengikat mineral Zn, Fe, Mg, Ca, dan protein. Mineral dan senyawa lain yang terikat asam fitat tidak dapat diserap sistem pencernaan sehingga akan terbuang bersama urin dan feses. *Fitase* merupakan enzim yang mampu menghidrolisis asam fitat, sehingga nutrisi yang terikat dapat dilepaskan (Miswar, 2007).

Fitase memiliki peranan yang besar terhadap nilai nutrisi pada ransum non-ruminansia. Penambahan enzim fitase merupakan salah satu cara untuk mengatasi tingginya asam fitat dalam ransum, karena enzim fitase mempunyai kemampuan menghidrolisa asam fitat yang terkandung pada bahan pakan menjadi senyawa inositol dan glukosa serta senyawa fosfor anorganik. Senyawa-senyawa ini sangat berperan dalam proses respirasi untuk pembentukan ATP. Menurut Boyce *et al.* (2004) dalam Wulandari (2011) beberapa keuntungan penambahan enzim pada

pakan ternak antara lain: 1). Mendegradasi antinutrisi dalam makanan yang mengganggu pencernaan, 2). Meningkatkan ketersediaan nutrisi dari suatu bahan pakan yang tidak dapat terdegradasi oleh enzim pencernaan hewan ternak, 3). Sebagai suplemen terhadap aktivitas pencernaan pada hewan dalam masa pertumbuhan dan hewan pada masa penyembuhan, 4). Membantu efektifitas penyerapan nutrisi sehingga mengurangi dampak polusi kotoran ternak.

Penambahan fitase ke dalam ransum ayam boiler yang terdiri atas jagung dan gandum menunjukkan adanya peningkatan retensi fosfor dan kalsium pada ayam boiler (Perez-Vendrell *et al.*, 2000). Konsentrasi fosfor anorganik plasma, retensi fosfor dan kalsium juga meningkat setelah adanya penambahan fitase mikroba pada pakan babi (Lei *et al.*, 1993). Leske & Coon (1999) melaporkan bahwa penambahan fitase pada pakan ayam dapat meningkatkan kadar fosfor dalam pakan secara signifikan. Suplementasi enzim fitase pada pakan ayam dapat mengatasi sepenuhnya efek negatif yang berasosiasi dengan rendahnya kadar fosfor dan kalsium pada pakan yang diberikan (Magdalena *et al.*, 2013).

## **4.2 Identifikasi Morfologi**

Morfologi makroskopis dan mikroskopis sangat penting untuk mengidentifikasi khamir dikarenakan masing-masing spesies khamir mempunyai karakteristik morfologi yang berbeda-beda (Wuczowski *et al.*, 2007). Identifikasi khamir dilakukan menggunakan acuan buku *The Yeast : A Taxonomy Study* (Kurtzman dan Felt, 1998) yang meliputi pengamatan tekstur, warna, permukaan, bentuk, elavasi, dan tepi koloni pada pengamatan makroskopis, sedangkan untuk

pengamatan mikroskopis dilakukan dengan mengamati ukuran sel, reproduksi aseksual, dan bentuk sel dengan perbesaran 10x100 kali.

Khamir sejati secara morfologi hanya membentuk blastospora berbentuk bulat lonjong, silindris, oval atau bulat telur yang dipengaruhi oleh strainnya. Khamir merupakan organisme eukariot uniseluler yang umumnya bereproduksi dengan pembelahan melalui "*budding cell*". Reproduksi dapat dipengaruhi oleh keadaan lingkungan serta jumlah nutrisi yang tersedia bagi pertumbuhan sel (Roto *et al.*, 2015).

Identifikasi morfologi secara makroskopis dan mikroskopis ini dapat menentukan klasifikasi khamir penghasil enzim fitase dari biji jagung berdasarkan ciri dan karakteristik yang dimiliki. Hal ini dapat menambahkan pengetahuan tentang macam-macam makhluk hidup yang telah diciptakan oleh Allah SWT. Firman Allah surat Al-Baqarah ayat 31:

وَعَلَّمَ آدَمَ الْأَسْمَاءَ كُلَّهَا ثُمَّ عَرَضَهُمْ عَلَى الْمَلَائِكَةِ فَقَالَ أَنْبِئُونِي بِأَسْمَاءِ هَؤُلَاءِ إِنْ كُنْتُمْ صَادِقِينَ

Artinya:

“Dan Dia mengajarkan kepada Adam nama-nama (benda-benda) seluruhnya, kemudian mengemukannya kepada para malaikat lalu berfirman: “Sebutkan kepada-Ku nama benda-benda itu jika kamu memang benar orang-orang yang benar” (Al-Baqarah/02:31).

Lafad *الأَسْمَاءُ* makna penggalan ayat ini menjelaskan bahwa keistimewaan manusia adalah kemampuannya mengekspresikan apa yang terlintas dalam benaknya serta kemampuannya menangkap bahasa sehingga ini mengantarnya “mengetahui”. Kemampuan Di sisi lain, kemampuan manusia merumuskan idea dan memberi nama bagi segala sesuatu merupakan langkah menuju terciptanya manusia berpengetahuan (Shihab, 2002). Mengetahui dan mengenal sub kelas

khamir yang terdapat pada biji jagung juga dapat menambah pengetahuan kita mengenai makhluk ciptaan Allah. Manusia adalah ciptaan Allah yang berakal dan penciptaan dunia memiliki suatu tujuan dengan memberikan tanda-tanda bagi orang yang berakal, yaitu orang yang selalu mengingat Allah baik dalam keadaan berdiri, duduk, serta berbaring. Hal ini sesuai Firman Allah surat Ali-imran ayat 190 :

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَاخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِّأُولِي الْأَلْبَابِ

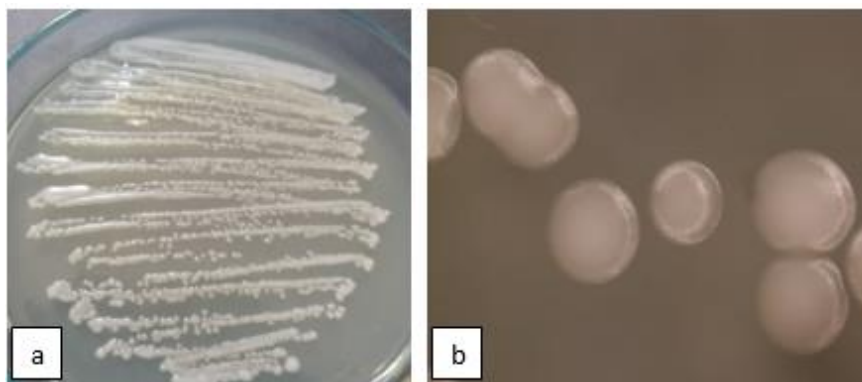
Artinya:

*“Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan silih bergantinya malam dan siang terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal”* (Ali-imran/03:190).

Kata الْأَلْبَابِ adalah bentuk jamak dari (لب) yaitu saripati sesuatu. Perumpamaan yang bisa diambil yakni pada kacang. Kacang memiliki kulit yang menutupi isinya. Isi kacang itulah yang dinamakan lubb. Ulul Albab adalah orang-orang yang berakal murni, tanpa diselubungi oleh “kulit” (yakni kabut ide) yang dapat menimbulkan kerancuan dalam berpikir. Seperti halnya merenungkan tentang fenomena alam raya dapat sampai kepada bukti yang sangat nyata tentang keesaan dan kekuasaan Allah SWT (Shihab, 2002). Bukti kekuasaan Allah juga bisa didapatkan dari hasil penelitian yang mampu menambah pengetahuan orang lain dan menjadi ilmu yang bermanfaat. Ilmu yang bermanfaat adalah amal yang akan dibawa mati.

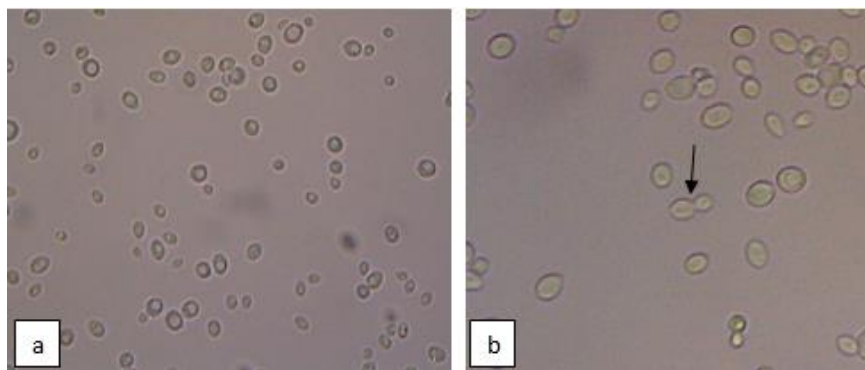
#### 4.2.1 Isolat Khamir Kode YFJ-1

Isolat khamir YFJ-1 yang diamati dari media YMEA memiliki koloni berwarna putih krem dengan permukaan mengkilap, tekstur seperti mentega, dan bentuk koloni bulat dengan elevasi yang timbul (Gambar 4.3 a). Pengamatan koloni khamir yang dilakukan dengan instrumen mikroskop stereo perbesaran satu kali menunjukkan khamir YFJ-1 memiliki bentuk koloni bulat dengan tepi tidak rata, elevasi timbul, dan tidak memiliki pseudohifa (Gambar 4.3 b). Berdasarkan pengamatan makroskopik, isolat khamir YFJ-1 tidak memproduksi pigmen warna yang merupakan salah satu ciri isolat khamir kelas *Ascomycetes*. Menurut Webster & Weber (2007) khamir kelas *Ascomycetes* umumnya tidak memiliki pigmen warna sehingga warna koloni khamir membentuk warna putih dan krem, sedangkan untuk khamir dari kelas *Basidiomycetes* umumnya memiliki pigmen warna kuning, orange, merah dan merah muda karena khamir ini mengandung karotenoid.



**Gambar 4.3. Pengamatan morfologi koloni YFJ-1.** a) koloni isolat YFJ-1 pada media YMEA, b) koloni isolat YFJ-1 dengan mikroskop stereo.

Hasil pengamatan mikroskopis dengan perbesaran 1000 x yaitu sel khamir memiliki bentuk bulat oval pendek dengan ukuran panjang sel khamir [(5,02 – 5,26) x (5,03 – 5,97)]  $\mu\text{m}$  dan tidak memiliki ballistopora (Gambar 4.4 a). Reproduksi aseksual isolat khamir YFJ-1 yakni *budding* holoblastik yang ditunjukkan pada tanda panah gambar 4.4 b. *Budding* merupakan bentuk reproduksi aseksual pada khamir dengan cara sel induk khamir membentuk sel baru atau sel anak. Selama perkembangan sel induk memiliki ukuran yang tetap, sedangkan sel anak akan bertambah besar sehingga akan lepas dari sel induknya (Yeong, 2005). Pembentukan yang blastik pada ujung sel yang membengkak yang kemudian menggelembung menjadi sel reproduksi yang dapat melepaskan diri dari sel induk, pertunasan yang dibentuk dengan cara ini disebut holoblastik (Gandjar & Sjamsuridzal, 2006).



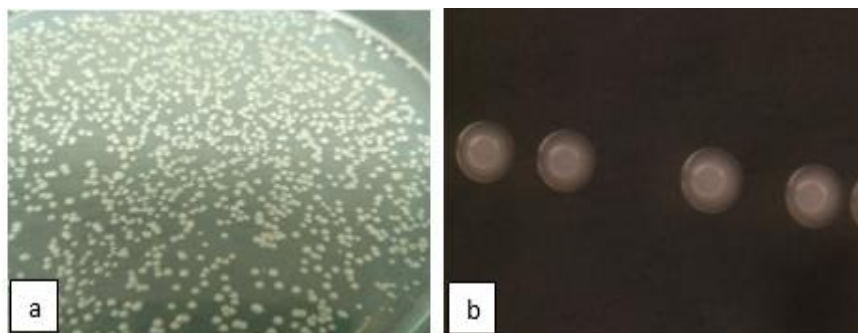
**Gambar 4.4. Pengamatan sel isolat YFJ-1 pada mikroskop perbesaran 1000x.**  
a) bentuk sel isolat YFJ-1, b) pertunasan *budding*

Berdasarkan pengamatan, *Budding* yang terbentuk pada isolat YFJ-1 memiliki tipe pertunasan mono polar (gambar 4.4 b). Menurut Gandjar & Sjamsuridzal (2006), pertunasan mono polar merupakan pertunasan yang terjadi

di satu kutub sel saja. Isolat khamir YFJ-1 memiliki bentuk reproduksi pembelahan sel vegetatif dengan terbentuknya budding yang merupakan ciri dari kelas *Ascomycetes* (Kurtzman & Fell, 1998). Karakteristik umum khamir ascomycetes yakni memiliki dinding sel dua lapis (bilayer) dan reproduksi aseksualnya berupa tipe pertunasan holoblastik, sedangkan Archiascomycetes dan Basidiomycetes memiliki tipe pertunasan enteroblastik (Gandjar & Sjamsuridzal, 2006).

#### 4.2.2 Isolat Khamir Kode YFJ-3

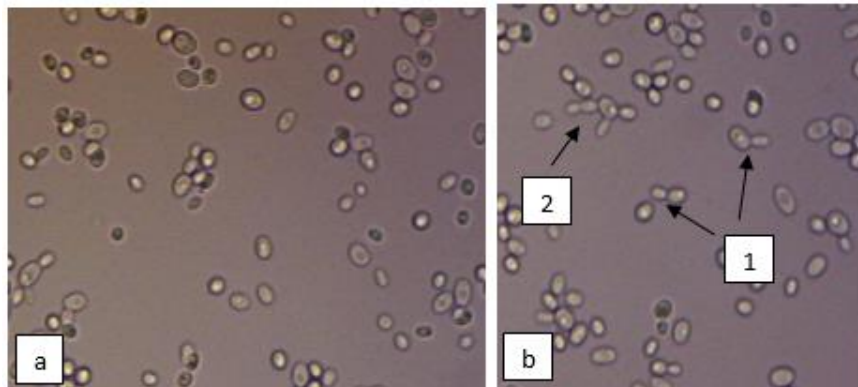
Isolat khamir YFJ-3 yang diamati dari media YMEA memiliki koloni bentuk bulat, elevasi timbul, tekstur berlendir, berwarna putih krem, permukaan halus (gambar 4.5 a). Pengamatan koloni khamir yang dilakukan dengan instrumen mikroskop stereo perbesaran satu kali menunjukkan khamir YFJ-3 memiliki bentuk koloni bulat dengan tepi rata, elevasi timbul, dan tidak ada hifa sejati ataupun hifa palsu (pseudohypha) (gambar 4.5 b).



**Gambar 4.5. Pengamatan morfologi koloni YFJ-3.** a) koloni isolat YFJ-3 pada media YMEA, b) koloni isolat YFJ-3 dengan mikroskop stereo

Isolat khamir kode YFJ-3 berdasarkan hasil pengamatan morfologi mikroskopis memiliki ukuran sel  $[(5,79 - 7,63) \times (5,99 - 8,11)] \mu\text{m}$ , tidak memiliki ballistopora, dan sel berbentuk oval. Khamir tersebut memiliki jenis reproduksi aseksual berupa *budding* holoblastik. Pertunasan dapat di katagorikan sebagai holoblastik atau heteroblastik berdasarkan bagaimana tunas dibentuk dalam ultrastruktur dinding sel. Pembentukan yang blastik pada ujung sel yang membengkak yang kemudian menggelembung menjadi sel reproduksi yang dapat melepaskan diri dari sel induk, pertunasan yang dibentuk dengan cara ini disebut holoblastik (Gandjar & Sjamsuridzal, 2006).

Hasil pengamatan mikroskopik menunjukkan bahwasanya isolate YFJ-3 memiliki dua tipe pertunasan berdasarkan posisi terjadinya pertunasan, yakni mono polar (gambar 4.6 b.1) dan multi polar atau multi lateral (gambar 4.6 b.2). Pertunasan monopolar merupakan tipe pertunasan yang terjadi di satu kutub sel saja, sedangkan pertunasan multi lateral atau multi polar, pertunasan yang terjadi di beberapa tempat pada permukaan sel. Gambar b pada panah nomor dua juga menunjukkan adanya pertunasan akropetal pada tunas multi lateral (gambar 4.6 b.2). Pertunasan akropetal adalah pembentukan tunas suksesif pada suatu rantai dengan bagian termuda pada apeks.



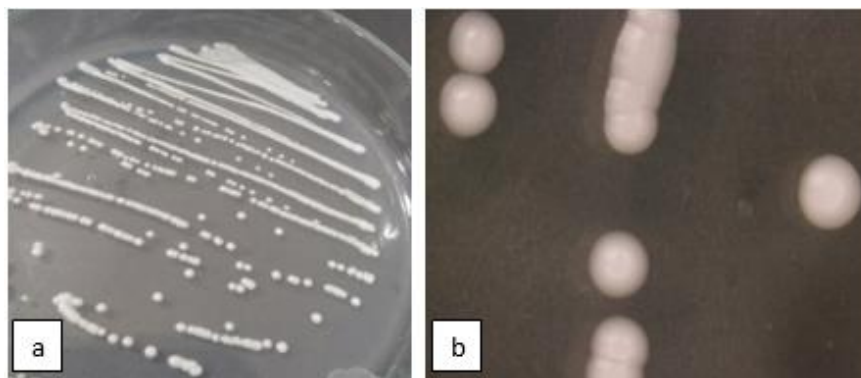
**Gambar 4.6** Pengamatan sel isolat YFJ-3 pada mikroskop perbesaran 1000x.  
 a) bentuk sel YFJ-3, b) Pertunasan *budding*, 1.) Mono polar, 2.)  
 Multi polar atau multi lateral

Berdasarkan karakteristik mikroskopik, isolat YFJ-3 dapat dimasukkan dalam kelas *Ascomycetes*. Klasifikasi umum khamir *Ascomycetes* yakni memiliki dinding sel dua lapis (bilayer) dan reproduksi aseksualnya berupa tipe pertunasan holoblastik, sedangkan *Archiascomycetes* dan *Basidiomycetes* memiliki tipe pertunasan enteroblastik (Gandjar & Sjamsuridzal, 2006). Hammamoto dan Nakase (2000), menyatakan bahwa reproduksi vegetatif khamir dengan *budding cell* termasuk dalam subkelas *Hemiascomycetes*. Kurtzman dan Fell (1998), menambahkan bahwa subkelas *Hemiascomycetes* termasuk dalam kelas *Ascomycetes*.

#### 4.2.3 Isolat Khamir Kode YFJ-4

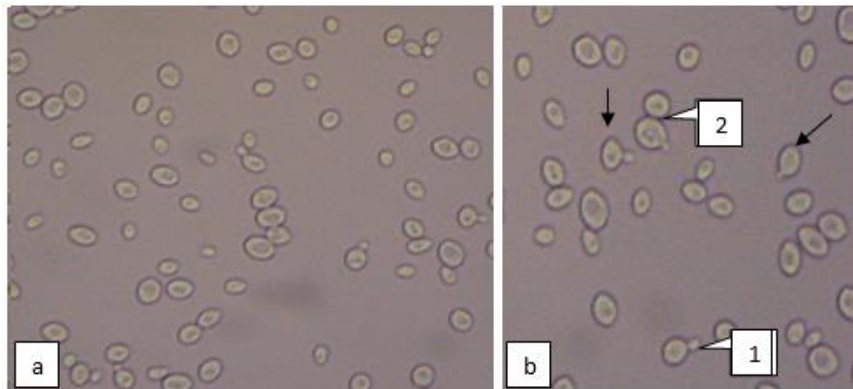
Isolat khamir YFJ-4 yang diamati dari media YMEA memiliki koloni bentuk koloni yaitu bulat, tekstur kental seperti mentega, putih bersih, permukaan halus elevasi timbul (gambar 4.7 a). Pengamatan koloni khamir yang dilakukan dengan instrumen mikroskop stereo perbesaran satu kali menunjukkan khamir

YFJ-4 memiliki bentuk koloni bulat, elevasi timbul, dan tepi rata (gambar 4.7 b). Berdasarkan penelitian De Oca *et al.* (2016), karakteristik yang dimiliki *Saccharomyces* yaitu memiliki warna putih, permukaan lembab dan tekstur halus. Ashliha dan Nur (2014) menambahkan bahwa koloni genus *Saccharomyces* memiliki tekstur kental, tidak berpigmen karotenoid, bentuk bundar dengan elevasi cembung atau timbul.



**Gambar 4.7. Pengamatan morfologi koloni isolat YFJ-4.** a) koloni isolat YFJ-4 pada media YMEA, b) koloni isolat YFJ-4 pada mikroskop stereo

Berdasarkan pengamatan mikroskopik, khamir pada isolate kode YFJ-4 memiliki bentuk sel oval, memiliki ukuran sel [(3,46 – 6,33) x (5,02 – 6,84)], tidak memiliki pseudohifa maupun hifa sejati (gambar 4.8 a). Khamir YFJ-4 memiliki reproduksi aseksual berupa *budding* holoblastic tipe pertunasan monopolar dan multi polar atau multi lateral (gambar 4.8 b.2). Berdasarkan hasil pengamatan morfologi mikroskopik yang diperoleh, isolat khamir dengan kode YFJ-4 tersebut memiliki kemiripan dengan khamir dari genus *Saccharomyces* dalam kelas *Ascomycetes*.



**Gambar 4.8. Pengamatan sel isolat YFJ-4 pada mikroskop perbesaran 1000x.**  
 a) bentuk sel isolat YFJ-4, b) pertunasan *budding*, 1. pertunasan *mono polar*, 2. pertunasan *multi polar*

Genus *Saccharomyces* pada khamir memiliki sel berbentuk oval dan memiliki tipe reproduksi vegetatif dengan *multilateral budding* (Ashliha dan Nur, 2014). Ciri *Saccharomyces* menurut Rafiqah (2010) yakni memiliki bentuk sel ogival, asci yang tidak mudah pecah, memiliki askospora dengan bentuk bulat-oval, dan tidak memiliki ballistopora. Pernyataan tersebut juga diperkuat oleh Nurhariyati, *et al.* (2004), yang menyatakan bahwa *Saccharomyces* memiliki karakteristik sel yaitu berbentuk bulat, oval pendek dan oval, pertunasan multilateral, memiliki variasi ukuran sel yaitu  $[(2,5-5) \times (3,5-5) - (3-6) \times (5-7,5)] \mu\text{m}$ , dan tidak ada hifa sejati ataupun hifa palsu (*pseudohypha*). Hammamoto dan Nakase (2000), menyatakan bahwa reproduksi vegetatif khamir dengan *budding cell* termasuk dalam subkelas *Hemiascomycetes* dan subkelas *Hemiascomycetes* termasuk dalam kelas *Ascomycetes* (Kurtzman dan Fell, 1998).

### 4.3 Identifikasi biokimia

#### 4.3.1 Uji Fermentasi Karbohidrat

Fermentasi adalah reaksi biokimia yang menghasilkan energi yang dilakukan oleh makhluk hidup dalam keadaan anaerobik dan senyawa organik berfungsi sebagai media dalam fermentasi (Harley & Prescott, 2002). Senyawa organik dapat berupa jenis karbohidrat. Pengujian fermentasi karbohidrat menggunakan jenis gula glukosa, fruktosa, dan sukrosa.

Media fermentasi karbohidrat menggunakan media *Andrade's Indicator* sebagai indikator warna dalam perubahan pH. Hasil fermentasi karbohidrat adalah terbentuknya gelembung pada tabung Durham. Jika terjadi pembentukan asam ditandai dengan warna merah muda pada media yang menggunakan indikator warna *Andrade's Indicator*. Proses pengujian fermentasi karbohidrat selama tujuh hari. Menurut Cazin (1969) hasil fermentasi karbohidrat biasanya diperoleh selama tujuh hari dan isolat khamir yang mampu menghasilkan gelembung selama tujuh hari menandakan fermentasi yang kuat dan terkait waktu pertumbuhan sel khamir yang optimal. Menurut Giri & Kindo (2015) adanya gelembung yang terdapat dalam tabung durham menandakan hasil positif dalam fermentasi gula dan apabila hanya ada perubahan pH menjadi asam menunjukkan hasil asimilasi karbohidrat dan pengujian dilakukan selama 7 hari dan setiap 24 jam dilakukan pengecekan warna dan gelembung pada tabung durham (Lampiran 5).

**Tabel 4.3. Kemampuan Isolat Khamir Dalam Memfermentasi Karbohidrat setelah 7 Hari Inkubasi**

No	Kode Isolat	Uji Fermentasi Karbohidrat		
		Glukosa	Fruktosa	Sukrosa
1	YFJ-1	++	+	-
2	YFJ-3	+	+	+
3	YFJ-4	+	+	+
4	Kontrol negatif	-	-	-

Keterangan: + = sedikit, ++ = cukup, +++ = banyak

- = tidak terdapat gelembung (Kurtzman & Fell, 1998)

**Tabel 4.4. Kemampuan Isolat Khamir dalam Perubahan pH**

Kode Isolat	Uji Fermentasi Karbohidrat					
	Glukosa		Fruktosa		Sukrosa	
	W	pH	W	pH	W	pH
YFJ-1	+	6	-	7	+	5
YFJ-3	+	5	+	5	-	7
YFJ-4	+	6	+	6	+	5
Kontrol negatif	-	-	-	-	-	-

Keterangan: W = warna

+ = adanya perubahan produksi asam atau basa ditandai perubahan warna pada indikator pH

- = tidak ada perubahan (warna netral, pH=7)

Berdasarkan tabel 4.3 isolat khamir memiliki kemampuan yang beragam dalam memfermentasi karbohidrat. Isolat YFJ-4 tidak mampu memfermentasi karbohidrat jenis sukrosa karena tidak terdapat gelembung pada tabung Durham. Sedangkan, pada isolat YFJ-1 dan YFJ-3 terjadi perubahan media fermentasi menjadi warna keruh dan terjadi pembentukan gelembung pada jenis fruktosa, glukosa, dan sukrosa. Kontrol negatif tidak terjadi pembentukan gelembung pada

tabung durham pada semua jenis gula.

Pengukuran nilai pH pada media sangat penting untuk mengetahui produk akhir baik berupa asam asetat atau etanol. Jika hasil produk akhir berupa asam asetat jika pH mengalami penurunan dan jika berubah menjadi etanol maka adanya peningkatan nilai pH. Nilai pH awal media fermentasi karbohidrat adalah 7 dan kontrol negatif setelah inkubasi selama 7 hari menunjukkan nilai pH 7. Berdasarkan tabel 4.3 dan lampiran 4 jenis gula sukrosa produk akhir pada isolat YFJ-1 dan YFJ-3 berupa etanol sedangkan YFJ-4 tidak terjadi proses fermentasi karbohidrat. Jenis gula fruktosa isolat YFJ-4 menghasilkan produk akhir berupa asam asetat sedangkan isolat YFJ-1 dan YFJ-3 produk akhir fermentasi berupa etanol. Isolat YFJ-4 pada jenis gula glukosa menghasilkan produk fermentasi berupa asam asetat sedangkan isolat YFJ-1 dan YFJ-3 berupa etanol.

Fermentasi karbohidrat oleh isolat khamir pada pengujian ini menunjukkan hasil akhir yang berbeda pada nilai pH, yakni ditemukan adanya peningkatan dan penurunan nilai pH. Peningkatan dan penurunan pH ini terjadi karena produk akhir yang dihasilkan berbeda karena tergantung jenis mikroorganisme yang terlibat. Menurut Harley & Prescott (2002) karbohidrat dapat difermentasi menjadi sejumlah produk akhir yang berbeda tergantung pada mikroorganisme yang terlibat. Produk akhir ini dapat berupa alkohol, asam, gas, atau molekul organik lainnya. Menurut Okafor (2007) hasil akhir fermentasi karbohidrat oleh khamir yaitu melepaskan karbon dioksida dan menghasilkan asam asetat dan etanol. Khamir yang menghasilkan asam asetat ditandai dengan menurunnya pH, sedangkan yang penghasil etanol dengan peningkatan pH. Fadhilah *et al* (2018)

menambahkan bahwa penurunan pH pada media terjadi karena pelepasan ion  $H^+$  ketika proses fermentasi sehingga menghasilkan asam organik dan peningkatan pH terjadi karena terjadi peningkatan ion  $OH^-$  karena khamir mengalami proses pertumbuhan.

#### **4.3.2 Uji fosfat**





Uji fosfat terlarut pada isolat khamir YFJ-1, YFJ-3, dan YFJ-4 asal biji jagung (*Zea mays* L.) menunjukkan hasil positif pada kedua media uji fosfat. Keberadaan fosfat terlarut secara kualitatif dapat ditunjukkan melalui perubahan warna dari reagen yang dicampur kedalam isolat khamir (lampiran 6). Secara kualitatif dapat terlihat bahwa kedua perlakuan, yakni enzim NSAPs hasil ekstrak dari *Pikovskaya broth* dan enzim fitase hasil ekstrak dari PSMB menunjukkan perubahan warna biru yang dihasilkan dari setiap isolat dengan kepekatan warna yang beragam.

Fungi pelarut fosfat mampu melarutkan fosfat dengan bantuan mekanisme secara biologis. Proses biologis yang berperan dalam kelarutan fosfat adalah enzim. Enzim ini disebut dengan asam fosfatase non-spesifik (NSAPs). Enzim NSAPs yang banyak dihasilkan oleh mikroorganisme adalah *fosfomonoesterase* atau *fosfatase* (Nannipieri *et al.*, 2011). Enzim ini dapat berupa asam atau alkali fosfomonoesterase (Jorquera *et al.*, 2011). Enzim lain yang juga berperan dalam kelarutan fosfat organik adalah phytase. Fitase merupakan enzim spesifik yang digunakan untuk menghidrolisis asam fitat menjadi fosfor (Yanuartono, 2017).

Uji fosfat pada enzim NSAPs menunjukkan bahwasanya isolat YFJ-4 dan YFJ-1 menunjukkan hasil warna biru tua, sedangkan pada YFJ-3 menunjukkan warna biru yang lebih muda (tabel 4.5). Hasil perlakuan uji fosfat dengan enzim fitase menunjukkan bahwasannya isolat khamir dengan kode YFJ 4 menunjukkan warna yang lebih gelap dibandingkan YFJ-3 dan YFJ-4 (tabel 4.6). Hal ini mengindikasikan tingkat konsentrasi fosfat yang dapat dilarutkan oleh khamir. Menurut Pradhan & Pokhrel (2013), hasil kepekatan warna biru dari reaksi biru molybdenum dapat menunjukkan tingkat konsentrasi fosfat terlarut yang dihasilkan sampel.





Warna biru yang menunjukkan hasil positif dalam uji fosfat terlarut merupakan hasil reduksi asam heteropoli 12 molibdofosfat. Menurut Pradhan & Pokhrel (2013), Asam fosfat (fosfat terlarut) akan berikatan dengan ammonium molibdat dan membentuk asam heteropoli. Kemudian asam heteropoli direduksi oleh hidrazin sulfat dan membentuk fosfomolibdenum dengan memberikan warna biru pada larutan. Indikator warna biru ini tidak berlaku untuk perlakuan kontrol negatif. Perlakuan kontrol negatif tidak mengandung fosfat terlarut sehingga reduksi asam heteropoli 12 molibdofosfat tidak terjadi. Kontrol negatif ditunjukkan dengan perubahan warna larutan menjadi kuning cerah.

**Tabel 4.5 Reaksi biru molibdenum pada isolat khamir dari jagung dengan media *Pikovskaya broth***

Nama Isolat	Isolat YFJ-1	Isolat YFJ-3	Isolat YFJ-4	Kontrol negatif
Kepekatan Warna	++	+	++	-
Hasil reaksi warna biru molibdenum				

Keterangan : (-) kuning cerah  
 (+) biru muda  
 (++) biru tua

**Tabel 4.6 Reaksi biru molibdenum pada isolat khamir dari jagung dengan media PSMB (*Phytase Selective Medium Broth*)**

Nama Isolat	Isolat YFJ-1	Isolat YFJ-3	Isolat YFJ-4	Kontrol negatif
Kepekatan Warna	+	++	++	-
Hasil reaksi warna biru molibdenum				

Keterangan : (-) kuning cerah  
 (+) biru muda  
 (++) biru tua

Komposisi reagen yang digunakan menjadi parameter eksperimen yang beragam seperti konsentrasi ammonium molibdat, asam sulfat, hidrazin untuk stabilitas penentuan fosfat yang efektif (Pradhan & Pokhrel, 2013). Selain komposisi reagen. Waktu perubahan warna yang dibutuhkan setiap isolat saat bereaksi dengan reagen biru molybdenum juga berbeda. Isolat YFJ 3 menunjukkan perubahan warna dalam waktu yang lebih cepat saat diberi reagen biru molibdenum. Isolat YFJ-1 dan YFJ-4 menunjukkan waktu yang relatif lebih lama untuk perubahan warna saat bereaksi dengan reagen biru molybdenum. Kecepatan reaksi biru molibenum yang terjadi menunjukkan kemampuan setiap isolat khamir berbeda dalam melarutkan fosfat. Hal ini diperkuat oleh pernyataan Syamsia *et al.*, (2016), fungi endofit menghasilkan jumlah serta jenis asam organik yang berbeda dalam menghasilkan fosfat terlarut, sehingga fosfat terlarut yang dihasilkan bervariasi.

## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

1. Hasil uji enzim fitase berdasarkan skrining fitase menunjukkan semua khamir hasil isolasi dari biji jagung mampu menghasilkan enzim fitase yang ditandai dengan terbentuknya zona bening pada media agar selektif fitase (PSMA). Zona hidrolitik terbesar di peroleh isolat dengan kode YFJ-4, YFJ-3, YFJ 1, YFJ-2, dan YFJ-5 yakni dengan masing-masing indeks hidrolitik sebesar 3,69 mm; 3,36 mm; 3,26 mm; 2,10 mm; dan 1.81 mm. Uji aktivitas fitase dilakukan pada tiga isolat dengan zona hidrolitik tertinggi, yakni isolat YFJ-4, YFJ-3, dan YFJ-1 dengan masing-masing isolat menghasilkan aktivitas fitase sebesar  $0,144 \text{ U/mL} \pm 9,501 \text{ U/mL}$ ;  $0,117 \text{ U/mL} \pm 6,831 \text{ U/mL}$ ; dan  $0,093 \text{ U/mL} \pm 3,873 \text{ U/mL}$ .
2. Hasil yang diperoleh dari pengamatan morfologi secara makroskopik dan mikroskopik, khamir dari biji jagung yakni isolat YFJ-1, YFJ-3, dan YFJ 4 dapat diklasifikasikan ke dalam kelas Ascomycetes.
3. Berdasarkan uji fermentasi karbohidrat (fruktosa, glukosa, dan sukrosa) semua isolat mampu mefermentasi ketiga jenis gula tersebut kecuali isolat YFJ-1 yang tidak mampu memfermentasi sukrosa. Uji fosfat dengan reagen fosfomolibdat menunjukkan bahwasannya isolat YFJ-1, YFJ-3, dan YFJ 4 memiliki kemampuan melarutkan fosfat yang ditandai adanya perubahan warna pada reagen.

## **5.2 Saran**

1. Perlu dilakukan uji suhu dan pH media yang bervariasi guna mengetahui karakteristik fitase pada isolat sampel.
2. Perlu lebih banyak parameter pengamatan morfologi, biokimia, dan uji molekuler untuk mendapatkan klasifikasi khamir yang lebih spesifik hingga ketinggian spesies.

## DAFTAR PUSTAKA

- AAK. 1993. *Teknik Bercocok Tanam Jagung*. Yogyakarta: Kanisius. Hlm 40-72.
- Ahmad, T., Rassol, S., Sarwar, M., Haq, A., & Hasan, Z. 2000. Effect of Microbial Phytase Produced from a Fungus *Aspergillus niger* on Bioavailability of Phosphorus and Calcium in Broiler Chicken. *Anim. Feed Sci. Technol.* 83:103-114.
- Aly, A.H., Debbab, A., Kjer, J., & Proksch, P. 2010. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. *Fungal Divers.* 41:1-16.
- Amelia, Roawita. 2010. Karakterisasi Isolat Bakteri Penghasil Fitase Asal Kudu Jagung (*Sitophilus zeamays*). *Tesis*. Program Studi Bioteknologi. Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Amzeri, Achmad. 2018. Tinjauan Perkembangan Pertanian Jagung di Madura dan Alternatif Pengolahan Menjadi Biomaterial. *Jurnal Rekayasa.* 11(1):74-86.
- Ashliha I. N. & Nur H. N. 2014. Karakterisasi Khamir dari Pulau Poteran Madura. *Jurnal Sains dan Seni Pomits.* 3(2):2337-3520.
- Ashshoffa F. N. D. & Yuliani. 2019. Pengaruh Media Propagasi MYE (*Malt Yeast Extract*) dan MS (*Murashige and Skoog*) terhadap Diameter dan Berat Talus Lichen *Parmelia sulcata* secara In Vitro. *Lentera Bio.* 8(3):243-248.
- Atlas, R. M. 2005. *Media for Environmental Microbiology*. Second Edition. Boca Raton: CRC Press.
- Balarabe, M., Mohammed, S. 2017. Physicochemical Analysis and Sensory Evaluation of Bread Produced Using Different Indigenous Yeast Isolats. *Science World Journal.* 12(1).
- Bhatia, S.C. 2016. *Food Biotechnology*. New Delhi: Woodhead Publishing India Ltd.
- Bilyeu, K.D., Zeng, P., Coello, P., Zhang, Z.J., KrishnanBailey, H.B., Beuselinck, P.R., & Polacco, J.C. 2008. Quantitative Conversion of Phytate to Inorganic Phosphorus in Soybean Seeds Expressing A Bacterial Phytase. *Plant Physiol.* 146:468-477.

- Biomedical Engineering. 2015. *Preparation Of Culture Media, Agar Plates, Antibiotics And General Necessities*. Netherlands: Endhoven University of Technology.
- Boekhout, T., & Phaff, H.J. 2003. Yeast Biodiversity. In : Boekhout, T. and Robert, V. (Ed). *Yeasts In Food: Beneficial and Detrimental Aspects*. Boca Raton: CRC Press. Hal:1-38.
- Bohn L, Meyer A S, & Rasmussen SK. 2008. Phytate: Impact on Environment and Human Nutrition A Challenge for Molecular Breeding. *J Zhejiang Univ Sci B*. 9:165-191.
- Cao L.W., Wang C., Yang Y., Yang J., Diana A., Yakupitiyage Z., Luo & Lie D. 2007. Application of Microbial Phytase in Fish Feed. *J. Enzyme and Microbial Technology*. 40:497-507.
- Coulibaly A, Kouakou B, & Chen J. 2011. Phytic Acid in Cereal Grains, Healty or Harmful Ways to Reduce Phytic Acid in Cereal Grains and Their Effects on Nutritional Quality. *Am J Plant Nutr Fertil Technology*. 1(1):1-22.
- Cyriacus, I., & Kingsley, N. 2010. Fungi Associated with Deterioration of Soursop (*Anona Muricata* Linn.) Fruits in Abia State, Nigeria. *African Journal of Microbiology Research*. 4(3):143-146.
- Damardjati, D. S. 1988. Struktur kandungan gizi beras. Dalam: Ismunadji, M., S.Partohardjono, M.Syam, A. Widjono. *Padi-Buku 1*. Balai Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Pusat Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan, Bogor. Hal: 103-159.
- De Becze, G. I. 1956. Yeasts: I. Morphology. *Applied microbiology*. 4(1).
- De Oca Montes, R.,Pérez, L.S., Salem, A.Z.M.,Kholif, A.E., Monroy, H.,Zamora, J.L. & Gutiérrez, A. 2016. Yeast: Description and Structure. *Research Gate*.
- Delfita, Rina. 2011. Isolasi dan Karakterisasi Enzim Phytase Microflora Endofitik Tanaman Kedelai (*Glycine max* (L.) Merril). *Jurnal Sainstek*. 3(1):8-20.
- Departemen Agama Republik Indonesia. 2010. *Al-Qur'an dan Terjemahnya*. Bandung: PT. Sygma Examedia Arkanleema.
- Dewanto F.G., J.J.M.R. Londok. R.A.V. Tuturoong, & W.B. Kaunang. 2013. Pengaruh Pemupukan Anorganik dan Organik Terhadap Produksi Tanaman Jagung Sebagai Sumber Pakan. *Jurnal Zootek*. 32(5). Issn 0852-2626.

- Djokorijanto., Sri, Luwihana. 1986. Permasalahan asam fitat dalam makanan. *Agritech*. 6(1&2).
- Fardiaz, D. S. 1992. *Mikrobiologi Pangan 1*. Jakarta: PT Gramedia.
- Fardiaz. 2009. *Mikrobiologi Pangan*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.
- Fell, J.W., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G., & Statzell Tallman, A. 2000. Biodiversity and Systematics and Basidiomycetes Yeasts As Determined by Large-Subunit Rdna d1/d2 Domain Sequence Analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50(3):1351-1371.
- Fesal. 2013. *Pengolahan Limbah Tanaman Jagung Untuk Pakan Ternak Sapi Potong*. Seminar Nasional Inovasi Teknologi Pertanian. Balai Penelitian Tanaman Serealia. Balai Penelitian Tanaman Serealia.
- Gandjar, I. dan Sjamsuridzal, W. 2006. *Mikologi: Dasar dan Terapan*. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia.
- Giri, S., & Kindo, M. J. 2015. Evaluation of Five Phenotypic Test In The Identification Of Candida Species. *Nat J Lab Med*. 4:13-18.
- Greiner R. Konietzny U. 2006. Phytase for Food Application. *Food Tech Biotech*. 44(2):125-140.
- Hamamoto, M., & Nakase, T. 2000. Phylogenetic Relationships Among Fungi Inferred From Small Subunit Ribosomal RNA Gene Sequences.
- Harley, J. P. & L. M. Prescott. 2002. *Laboratory Exercise in Microbiology*. 5<sup>th</sup> edition. New York: McGraw-Hill Education.
- Hasiani V. V., Islamudin A., & Laode R., 2015. Isolasi Jamur Endofit dan Produksi Metabolit Sekunder Antioksidan dari Daun Pacar (*Lawsonia inermis* L.). *Jurnal Sains dan Kesehatan*. 1(4).
- Hassouni, H., Ismail, M., Alaoui., I., Gaime, P.I., Augur, C., & Rousses, S. 2006. Effect of Culture Media and Fermentation Parameters on Phytase Production by The Thermophilic Fungus *Mycelophothora thermophila* in Solid State Fermentation. *Mycologi Aplicada Int*. 18:29-36.
- Hitz, W. D. ; T. J. Carlson; P. S. Kerr; & 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.

- James, S.A., Collins, M.D & Roberts, I.N. 1996. Use of An Rrna Internal Transcribed Spacer Region to Distinguish Phylogenetically Closely Related Species of The Genera *Zygosaccharomyces* And *Torulaspota*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 46(1):189-194.
- Jindamorakot, S., S. Ninomiya, S. Limtong, & W. Yongmanitchai. 2009. Three Newspecies Of Bipolar Budding Yeast Of The Genus *Hanseniaspora* and Its Anamorph *Kloeckera* isolatd in Thailand. *FEMS Yeast Research*. 9(8):1327-1337.
- Johnson, E.A. & Carlos Echavarri-Erasun. *Yeast Biotechnology Chapter 3*, in The Yeasts, a Taxonomic Study. 2011. Elsevier B.V. All rights Reserved. Eds: Kurtzman, P.C., Fell, J.W., & Boekhout, T. Hal: 21-44.
- 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.
- Kanti, A. 2004. Identifikasi Jenis Khamir yang Diisolasi dari Tanah Gambut Taman Nasional Bukit Duabelas, Jambi. *BioSMART*. (6)10.
- Kasryno F, Pasandaran E & Fagi A.M. 2008. *Ekonomi Jagung Indonesia*. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Hal:37-72.
- Kathirvelan C, Janani SR, Ramesh J, & Pur Ushothaman MR. 2015. Significance of usage of phytase in poultry nutrition. *Int J Sci Env Tech*. 4:1214-1217.
- Kementan. 2013. *Data Statistik Ketahanan Pangan tahun 2012*. Jakarta: Badan Ketahanan Pangan Kementerian Pertanian.
- Kerovuo, J. 2000. *A novel phytase from Bacillus: Characterization and Production of the enzym*. Dissertation Univ. Helsinki, Finland.
- Kerovuo, J., M Lauraeus., P. Nurminen., N. Kalknnen & J. Apajalahti. 1998. Isolation, characterization, molecular gene cloning and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*". *Applied Environmental Microbiology*.
- Khan, S.A., Chaudhry,H.R., Butt, Y.S., Jameel,T.,and Ahmad, F. 2013. The Effect of Phytase Enzyme on The Performance of Broilers. *Biol Pakistan*. 59:99-106.
- Kharwar, R.N., Mishra, A., Gond, S.K., Stierle, A., & Stierle, D. 2011. Anticancer Compounds Derived from Fungal Endophytes: Their Importance and Future Challenges. *Nat. Prod. Rep*. 28:1208–1228.

- Khrisna C. 2005. Solid-state Fermentation on System an Overview. *Biotechnol.* 25:1-30.
- Konietzny & Greiner R. 2002. Molecular and Catalytic Properties of Phytate Degrading Enzyme (Phytase). *Int. J. Sci. Technol.* 37:791-812.
- Kumar V, Sinha AK, Makkar HPS, & Becker K. 2010. Dietary Roles of Phytate and Phytase in Human Nutrition: A Review. *Food Chemistry.* 120(4):945-959.
- 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.
- Kurniawati, Yulia R., & Yuanita, L. 2014. Pengaruh Asam Sitrat dan Fitase *Bacillus subtilis* Hg Pada Jagung (*Zea mays* L) Terhadap Bioavailabilitas Mineral Ca (in-vitro). *UNESA Jurnal Of Chemistry.* 3(1):96-102.
- Kurtzman C. P & J. W. Fell. 1998. *The Yeast: A Taxonomic Study.* Amsterdam: Elsevier.
- Kurtzman, C. P., & Fell, J. W. 2006. Yeast Systematics and Phylogeny Implications Of Molecular Identification Methods For Studies In Ecology. In *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts.* Springer, Berlin, Heidelberg.
- Kurtzman C. P., & Piškur, J. 2006. Taxonomy And Phylogenetic Diversity Among The Yeasts. In *Comparative Genomics.* Springer, Berlin, Heidelberg.
- Kurtzman, C. P., & Sugiyama, J. 2001. Ascomycetous Yeasts and Yeastlike Taxa. In *Systematics and Evolution.* Springer, Berlin, Heidelberg.
- Kusari, S., and Spiteller, M. 2012. Metabolomics of endophytic fungi producing associated plant secondary metabolites: progress, challenges and opportunities. In *Metabolomics*, U. Roessner, ed. (Rijeka, Croatia: InTech), pp. 241–266.
- Kusari, S., Kosuth, J., Cellarova, E., and Spiteller, M. 2011. Survival strategies of endophytic *Fusarium solani* against indigenous camptothecin biosynthesis. *Fungal Ecol.* 4: 219–223.
- 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.

- Lambrechts C, Boze H, Moulin G, & Galzy P. 1992. Utilization of Phytate By Some Yeasts. *Biotech Lett.* 14(1):61-66.
- Lei X, Ku PK, Miller ER, Ullrey DE, & Yokoyama MT. 1993, Supplemental Microbial Phytase Improve Availability of Dietary Zinc to Weanling Pigs. *J Nutr.* 123:1117-1123.
- Leske, K. L., & C. N. Coon. 1999. A Bioassay to Determine The Effect Of Phytase on Phytate Phosphorus Hydrolysis and Total Phosphorus Retention to Feed Ingredients as Determined with Broilers and Laying Hens. *Poult Sci.* 78:1151-1157.
- Lim, S.J., Kim S.S., Pham, M.A., Song, J.W., Cha, J.H., Kim, J.D., Kim, J.U., & Lee, K.J. 2010. Effects Of Fermented Cottonseed and Soybean Meal With Phytase Supplementation On Gossypol Degradation, Phosphorus Availability, and Growth Performance Of Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fisheries and Aquatic Sciences.* 13(4):284-293.
- Liu, B. L., Raviq, A., Tzeng, Y.M. & Rob, A. 1998. The Induction and Characterization Of Phytase and Beyond Enzyme *Microbiol. Technol.* 22:415- 424.
- Lovelss, A. R. 1989. *Prinsip-Prinsip Biologi Tumbuhan Untuk Daerah Tropik 2.* Jakarta: Gramedia.
- Ma'aruf, A.G., Z. Noroul Asyikeen, A.M. Sahilah & A. Mohd. Khan. 2011. Leavening Ability of Yeast Isolatd From Different Local Fruits In Bakery Product. *Sains Malaysiana.* 40(12):1413–1419.
- Magdalena, F., Sudiarso, & Sumarni, T. 2013. Penggunaan Pupuk Kandang dan Pupuk Hijau *Crotalaria juncea* L. untuk Mengurangi Penggunaan Pupuk Anorganik Pada Tanaman Jagung (*Zea mays* L.). *J. Produksi Tanaman I* 2:61-71.
- Marlida, Y. Gita C, & Rina D. 2010. *Produksi dan Karakterisasi Enzim Phytase dari Mikroba Endofitik dan Aplikasinya untuk Meningkatkan Kualitas Pakan Unggas.* Depertement of animal nutrion, faculty of animal scince, andalas University. Padang.
- Miswar. 2007. Peningkatan biosintesis sukrosa tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.) melalui overekpresi gen Sucrose Phospate Synthase (SPS). Disertasi (tidak dipublikasikan). Universitas Jember. Jember.
- Mittal, Arfana., Gulab Singh., Varsha Goyal., Anita Yadav., Kamal Rai Aneja.,Sanjeev Kumar Gautam., & Neeraj Kumar Aggarwal. 2011. Isolation And Biochemical Characterization Of Acid-Thermophilic Extracellular

- Phytase Producing Bacterial Strain For Potential Application In Poultry Feed. *Jundishapur Journal of microbiology*. 4(4):273-282.
- Morris, E.R. 1986. Phytate and Dietary Mineral Bioavailability. In: E. Graf (Ed). *Phytic acid chemistry and applications*. USA: Pilatus Press.
- Nakamura, Y., H. Fukuhara, & K. Sano. 2000. Secreted Phytase Activities of Yeasts. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 64(4):841-844.
- Nampoothiri KM, Tomes GJ, Roopesh K, Szakacs G, Nagy V, Soccol CR, Pandey A. 2004. Thermostable phytase production by *Thermoascus aurantiacus* in submerged fermentation. *Appl Biochem Biotech*. 118(1): 205-214.
- Nuhriawangsa, A. M. P., Z. Bachruddin, Sajidan, & A. Wibowo. 2012. Aplikasi Fitase dari Bakeri Rekombinan pEASI-AMP untuk Meningkatkan Kualitas Pakan dan Kinerja Produksi Ayam Broiler Yang Ramah Lingkungan. Dalam: *prosiding seminar nasional peternakan berkelanjutan 4: Inovasi agribisnis peternakan untuk ketahanan pangan: komoditas unggas*. Fakultas peternakan UNPAD, Bandung. Hal: 220-225.
- Nuobariene L., Ase S. Hansen, & Nils A. 2012. Isolation and Identification of Phytase-active Yeasts from Sourdoughs. *Food Science and Technology*. 48(2):190-196.
- O'Dell, BL., de Boland, A.R., & Koirtyohann, S.T. 1972. Distribution of Phytate and Nutritionally Important Elements Among The Morphological Components of Cereal Grains. *J. Agric. Food Chem*. 20(3):718-723.
- Ogunremi, O.R., Renu A., & Abiodun S. 2020. Production and Characterization Of Volatile Compounds and Phytase From Potentially Probiotic Yeasts Isolated From Traditional Fermented Cereal Foods In Nigeria. *Journal Of Genetic Engineering and Biotechnology*. 18(16).
- Okafor, N. 2007. *Modern Industrial Micro biology an Biotechnology*. America: Science Publishers.
- Orole, O. O. & Adejumo, T. O. 2011. Bacterial and Fungal Endophytes Associated With Grains and Roots of Maize. *Journal of Ecology and the Natural Environment*. 3(9):298-303.
- Panikkai S., Rita, N., Sri, M., & Handewi P. 2017. Analisis Ketersediaan Jagung Nasional Menuju Pencapaian Swasembada Pendekatan Model Dinamik. *Informatika Pertanian*. 26(1):41-48.

- Pelczar, M. J., & E. S. C. Chan. 1998. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jakarta: UI Press.
- Pelczar, M.J., E.C.S. Chan, & Noel R.Krieg 2008. *Microbiology*. Fifth Edition. New Delhi: McGraw-Hill Publishing company Limited.
- Perez-Vendrell, A.M, Ruiz, J. A., & Esteve-Garcia, E. 2000. Effect of Dietary Iron and Copper On Performance and Oxidative Stability In Broiler Leg Meat. *British Poultry Science*. 41(2):163–167.
- Pradhan, S. & Pokhrel, M.R. 2013. Spectrophotometric Determination Of Phosphate In Sugarcane Juice, Fertilizer, Detergent and Water Samples By Molybdenum Blue Method. *Scientific World*. 11(11).
- Pratiwi, Syvilia T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta: Erlangga.
- Querol, A., & Fleet, G. H. 2006. *Yeast and Food Beverages*. Germany: Springer Verlag Heindenberg.
- Raboy, V., & Dickinson, D. B. 1993. Phytic Acid Levels in Seeds of Glycine Max and G. soja as Influenced by Phosphorus Status. *Crop Science*. 33(6):1300-1305.
- Rafiqah N. 2010. Studi Viabilitas Khamir pada Fermentasi Tauco dalam Larutan Garam. *Tesis*. Universitas Sumatra Utara. Medan.
- Ramachandran S, Roopesh K, Nampoothiri KM, Szakacs G, & Pandey A. 2005. Mixed Substrate Fermentation For The Production Of Phytase By *Rhizopus* Spp. Using Oilcakes As Substrates. *Proc Biochem*. 40(1):1749-1754.
- Ramadhan, Muhammad, Fakhri. 2016. Penapisan Khamir Ascomycota Penghasil Fitase Dan Penentuan Kondisi Optimum Produksinya. *Skripsi*. Institute pertanian bogor. Bogor.
- Rashid, A. N. M. Mamun-Or, Biplab Kumar Dash, Md. Nurul Abadin Chowdhury, Momtaz Fatima Wah eed & Md. Kamruzzaman Pramanik. 2013. Exploration of Potential Baker's Yeast from Sugarcane Juice: Optimization and Evaluation. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 16(13):617-623
- Reddy NR, Sathe SK, & Salunkhe DK. 1982. Phytates in Legumes and Cereals. *Adv Food Res*. 28: 1-92. PMID: 6299067
- Rhodes, A & D.L. Fletcher. 1966. *Principles of Industrial Microbiology*. New York: Pergamon Press.

- Rinaldi, Ernita M., & Marni Y. 2009. *Pertumbuhan dan Hasil Tanaman Jagung (Zea mays) Yang Ditumpangсарikan Dengan Kedelai (Glycine max)*. Agroteknologi. Universitas Tamansiswa. Padang.
- Rini, A.W.E. 2017. *Isolasi dan Identifikasi Khamir Toleran Alkohol dari Molases. Skripsi*. Universitas Jember. Jember
- Roostita, R. 1993. Occurrence, Growth and Biochemical Properties of Yeasts in Cheeses and Milk. *Thesis*. The University of New South Wales, Australia.
- 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).
- Rubatsky, V. W. & M. Yamaguchi. 1998. *Sayuran Dunia I Prinsip, Produksi Dan Biji*. Diterjemahkan oleh Catur Heriston. Bandung: ITB.
- Rukmana R. 1997. *Usaha Tani Jagung*. Yogyakarta: Kanisius.
- Sajidan, A.M.P. Nuhriawangsa & A. Ratriyanto, 2004. Aplikasi Bakteri Penghasil Fitase (non rekombinan) pada Pakan Campuran Wheat Pollard terhadap Performan Ayam Broiler. *Buletin Peternakan UGM* . 28(3):114-121.
- Sano K, Fukuhara H, & Nakamura Y. 1999. Phytase of the yeast *Arxula adenivorans*. *Biotechnol. Lett*. 21:33–38.
- Santos T. 2011. Optimisation of Phytase Production by *Aspergillus niger* Using Solid State Fermentation. *Thesis*. National University of Ireland. Irlandia.
- 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, Novita Evi. 2012. Identifikasi Bakteri Penghasil Fitase Berdasarkan Gen 16S rRNA dan Karakterisasi Fitase dari Kawah Sikidang Dieng. *Tesis*. Program Studi Biosain Pascasarjana Universitas sebelas maret. Surakarta.
- 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.
- Saribuga E, Nadaroglu H, Dikbas N, Senol M, Cetin B. 2014. Purification, characterization of phytase enzyme from *Lactobacillus plantarum* bacteria and determination of its kinetic properties. *Afr J Biotech*. 13(23):2373-2378.

- Sariubang M. & Herniwati. 2011. *Sistem Pertanaman dan Produksi Biomass Jagung Sebagai Pakan Ternak*. Seminar Nasional Serelia. Hal; 237-244.
- Sartini, Rita F., dan Rosliana. 2018. Pengaruh Kadar Asam Sulfat Pada Hidrolisis Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKS) dan Waktu Fermentasi Terhadap Kadar Bioetanol yang Dihasilkan. *BioLink*. (4) 2.
- Sastrohamidjojo, H. 2005. *Kimia Organik, Stereokimia, Karbohidrat, Lemak, dan Protein*. Yogyakarta: UGM Press.
- Satyanaraya, T. & Kunze, G. 2009. *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*. New Delhi: Springer Science.
- Schulz, B.J.E., & Boyle, C.J.C. 2006. *What are endophytes? In Microbial Root Endophytes*, B.J.E. Schulz, C.J.C. Boyle, and T.N. Sieber, eds. (Berlin: Springer-Verlag), pp. 1–13.
- Segueilha L, Lambrechts C, Boze H, Moulin G, & Galzy P. 1992. Purification and Properties Of The Phytase From *Schwanniomyces castellii*. *J. Ferm. Bioeng.* 74:7–11.
- Selle, P. H., Cowieson, A. J., & Ravindran, V. 2009. Consequences of Calcium Interactions With Phytate and Phytase For Poultry and Pigs. *Livestock Science*. 124(1-3):126–141.
- Selle, P.H., & Ravindran, V. 2007. Microbial phytase in poultry nutrition. *Animal Feed Science and Technology*. 135(1-2):1-41.
- Shihab, M. Q. 2002. *Tafsir Al-Mishbah: Pesan, Kesan, dan Keserasian Al-Quran*. Jakarta: Lentera Hati.
- Shumin, Y., Zhaoyanga, X., & Jinglia, T. 2012. Screening and Identification Of Halotolerant Yeast For Hydrocarbon Degrading and Its Properties Studies. *African Journal of Microbiology Research*. 6(8).
- Simell, M., Turunen, M., Piironen, J. & Vaara, T. 1989. Feed and food applications of phytase. Lecture at 3<sup>rd</sup> Meet. *Industrial Applications of Enzymes*, Barcelona, Spain.
- Singh N. K., Dharmendra Kumar Johsi., & Raj Kishor Guptar. 2013. Isolation Of Phytase Producing Bacteria and Optimization Of Phytase Production Parameters. Summer: *Jundishapur Journal of Microbiology*. 6(5):6419.
- Sjofjan, O. 2003. Kajian Probiotik (*Aspergillus niger* dan *Basillus* sp.) Sebagai Imbuhan Ransum dan Implikasinya Terhadap Mikroflora Usus serta Penampilan Produksi Ayam Petelur. *Disertas*. Universitas Padjajaran.

Bandung.

- Sokrab, A.M., Mohamed, A. I.A., & Babiker, E.E. 2012. Effect of germination on antinutritional factors, total, and extractable minerals of high and low phytate corn (*Zea mays* L.) genotypes. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. 11(2), Hal: 123–128.
- Soni SK, & Khire JM. 2007. Production and Partial Characterization Of Two Types Of Phytase From *Aspergillus niger* NCIM 563 Under Submerged Fermentation.
- Spencer, J.F.T. dan D.M. Spencer. 1997. Yeasts in Natural and Artificial Habitats. Berlin: Springer-Verlag, Heidelberg. ISBN-10: 3540568204.
- Stahl CH, Roneker KR, Thornton JR, & Lei XG. 2000. A New Phytase Expressed In Yeast Effectively Improves The Bioavailability Of Phytate Phosphorus To Weanling Pigs. *J. Anim. Sci*. 78:688–674.
- Staniek, A., Woerdenbag, H.J., & Kayser, O. 2008. Endophytes: Exploiting Biodiversity For The Improvement Of Natural Product-Based Drug Discovery. *J.Plant Interact*. 3:75–93.
- Starmer WT, & Lachance MA. 2011. Yeast Ecology. In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. *The yeasts, ataxonomic study*. 5th Edition. Elsevier B. V. London, p. 65.
- Steiner, T., Mosenthin, R., Zimmermann, B., Greiner, R., & Roth, S. 2007. Distribution Of Phytase Activity, Total Phosphorus and Phytate Phosphorus In Legume Seeds, Cereals and Cereal By-Products As Influenced By Harvest Year and Cultivar. *Anim Feed Sci Technol*. 133(3-4):320-334.
- Strobel G., Bryn D., Uvidelio C., & James H.. 2004. Natural Products From Endophytic Microorganism. *Journal of Natural Products*. 67:257-268.
- Suarni & S. Widowati. 2001. Struktur, Komposisi, dan Nutrisi Jagung. *Jagung: Teknik Produksi dan Pengembangan*. Hal: 410-426.
- Subandi. 2010. *Mikrobiologi*. Bandung: PT Remaja Rosdakarya.
- Suhardjo & Lestari, IE., 2006. *Pengkajian Pengaruh Beberapa Varietas Jagung Terhadap Mutu Tortila*. Jawa Timur: Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Jawa Timur.
- Sumerta, I Nyoman & Atit Kanti. 2017. Keragaman Jenis Khamir Penghasil Etanol yang Diisolasi dari Makanan Fermentasi di Kepulauan Riau. *Jurnal Biologi Indonesia*. 13(1):61-69.

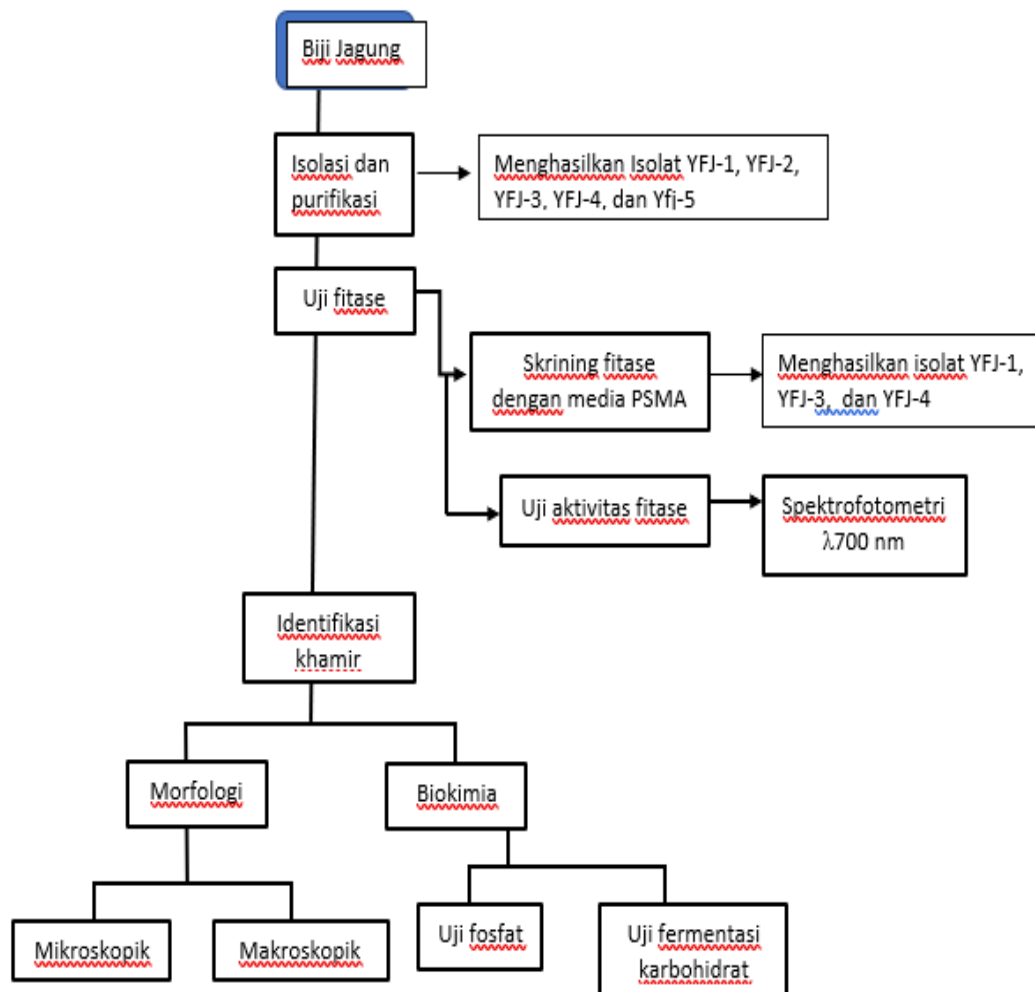
- Suryaningsih V, Rejeki S.F. & Endang K. 2018. Karakteristik Morfologi, Biokimia, dan Molekuler Isolat Khamir Ik-2 Hasil Isolasi Dari Jus Buah Sirsak (*Annona muricata* L.). *Jurnal Biologi*. 7(1):18-25.
- Sutarno, 1995. *Tanam Jagung*. Jakarta. Kanisius.
- Sutrisno, A. 2017. *Teknologi enzim*. Malang: UB Press.
- Syamsia, Abu bakar Idhan, & Muhammad Kadir. 2016. Potensi Cendawan Endofit Asal Padi Aromatik Lokal Enrekang Sebagai Pelarut Fosfat. *J. Agrotan*. 2(1):57 – 63.
- Tan, R.X. & W.X Zou. 2001. *Endophytes: a rich source of functional metabolites*. *Nat Prod. Rep*. 18:448-459.
- Tjitrosoepomo, C. 1991. *Taksonomi Tumbuhan*. Yogyakarta: Gajah Mada University Press.
- Tobing M. P. L. Ginting O. Ginting S & R. K Damanik. 1995. *Agronomi Tanaman Makanan I*. Fakultas Pertanian Universitas Sumatera Utara, Medan
- Trudy, McKee. 1999. *Biochemistry: An Introduction*. Second Edition. Amerika: McGraw Hill.
- Turker, Mustafa. 2014. *Yeast biotechnology: diversity and applications*. 27<sup>th</sup> VH yeast conference, Istanbul. Advances in science and industrial productions of baker's yeast.
- Vohra, A. & T. Satyanarayana. 2001. Phytase Production by the Yeast, *Pichia anomala*. *Biotechnology Letters*. 23:551-554.
- Walker G. M. 2009. *Yeasts*. In: M. Schaechter (Ed.) Desk Encyclopedia of Microbiology. (pp. 1174-1187) 2nd ed. London: Elsevier/Academic Press.
- Waluyo, L. 2008. *Teknik Metode Dasar Mikrobiologi*. Malang: UMM Press.
- Warisno. 1998. *Jagung Hibrida*. Yogyakarta: Kanisius.
- Watanabe, M., Uchida, N., Fujita, K., Yoshino, T., & Sakaguchi, T. 2016. Bread and Effervescent Beverage Productions with Local Microbes for the Local Revitalization. *International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology*. 6(3):381-384.

- Webster and Weber. 2007. *Introduction to Fungi*. England: Cambridge University Press.
- Widiastutik, Naning & Nur Hidayatul Alami. 2014. Isolasi dan Identifikasi Yeast dari Rhizosfer *Rhizophora mucronata* Wonorejo. *Jurnal Sains dan Seni Pomits*. 3(1).
- 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.
- Wiratno E.N. & Novi S.R. 2018. Isolasi, Identifikasi Dan Produksi Etanol Khamir Indigenous Nira Siwalan (*Borassus flabellifer* L.) dari Tuban, Jawa Timur, Indonesia. *Jurnal Biotropika*. 06(1).
- Worang R. L. 2003. *Makalah Individu Pengantar Falsafah Sains (PPS702)*. Bogor: Program Pascasarjana/S3 Institut Pertanian Bogor.
- Woyengo TA, Guenter W, Sands JS, Nyachoti CM, & Mirza MA. 2008. Nutrient Utilisation and Performance Responses Of Broilers Fed A Wheat-Based Diet Supplemented With Phytase and Xylanase Alone Or In Combination. *Anim Feed Sci Technol*. 146:113-123.
- Woyengo, T. A., & Nyachoti, C. M. 2013. Review: Anti-nutritional effects of phytic acid in diets for pigs and poultry current knowledge and directions for future research. *Can. J. Anim. Sci*. 93(1):9-21.
- 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.
- Wulandari, Rita, Sajidan, & Suranto. 2011. Analisis Gen 16s rRNA pada Bakteri Penghasil Enzim Fitase. *Sikripsi*. Program Pasca Sarjana. Universitas Sebelah Maret Surakarta. Surakart.
- 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 Applications, *J. Applied Microbiol*. 112(1):1-14.
- Yarrow, 1998. Methods for The Isolation, Maintenance and Identification of Yeasts. In: Kurtzman, C.P & Fell, J.W. 1998. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. 4 rd. Amsterdam: Elsevier Science.

- Yousif M.R. & Safaa M. F. 2014. Effect of Using Different Types of Yeasts on the Quality of Egyptian Balady Bread. *Journal of American Science*. 10(2).
- Zarei, O., S. Dastmalchi, & M. Hamzeh-Mivehroud. 2016. A Simple and Rapid and Rapid Protocol for Producing Yeast Extract from *Saccharomyces cerevisiae* Suitable for Preparing Bacterial Culture Media. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 15(4):907-913.
- Zunaidah, S., dan Alami, N. H. (2014). Isolasi dan Karakterisasi Yeast dari Rhizosphere Avicennia Marina Wonorejo. *Jurnal Sains dan Seni ITS*. 3(1).

## LAMPIRAN

Lampiran 1. Diagram Alir Prosedur Penelitian



## Lampiran 2. Perhitungan Uji Kadar Fosfat

### A. Pembuatan Larutan Stok $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1000 ppm

$$\begin{aligned}\text{MR KH}_2\text{PO}_4 &= \text{AR K} + 2 \times \text{Ar H} + \text{Ar P} + 4 \times \text{Ar O} \\ &= 39,102 + (2 \times 1.008) + 30,97 + (4 \times 16) \\ &= 39,102 + 2,016 + 30,97 + 64 \\ &= 136,088\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}1000 \text{ ppm} &= 1000 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{1 \text{ gr}}{1000 \text{ mg}} \times \frac{\Sigma \text{ Total berat molekul bahan}}{\Sigma \text{ Total berat bahan molekul ion}} \\ &= 1000 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{1 \text{ gr}}{1000 \text{ mg}} \times \frac{136,088}{94,97} \\ &= 1,4329 \frac{\text{gram}}{\text{L}} = 1,433 \frac{\text{gram}}{\text{L}}\end{aligned}$$

~ dibutuhkan fosfat sebanyak 0,717 gram untuk takaran 500 ml aquades steril (non fosfat).

### B. Pembuatan sodium molibdat ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 2,5% sebanyak 100 ml

$$\text{Persen massa} = \frac{\text{Massa zat}}{\text{Masatotal senyawa}} \times 100$$

$$2,5 \% = \frac{\text{Massa zat}}{100 \text{ gr}} \times 100$$

$$\text{Massa zat} = 2,5 \text{ gr}$$

~ dibutuhkan 2,5 gram sodium molibdat ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) dan 97,5 ml air steril (non fosfat) untuk pembuatan larutan sodium molibdat 100 ml.

**C. Pembuatan Asam Sulfat (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 10 N sebanyak 100 mL**

$$N = \frac{(10 \times \text{Persentase larutan} \times \text{Berat Jenis}) \times \text{Valensi}}{\text{Berat Molekul}}$$

$$N = \frac{(10 \times 96\% \times 1,84 \text{ g/ml}) \times 2}{98,08 \text{ g/mol}}$$

$$N = 36 \text{ N}$$

$$N_1 V_1 = N_2 V_2$$

$$36 \times V_1 = 10 \times 100$$

$$V_1 = \frac{10 \times 100}{36} = 27,78 \text{ ml}$$

~ dibutuhkan 27,78 ml Asam Sulfat (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 96%) dan 72,22 ml Air Steril (non Fosfat) untuk pembuatan larutan sodium molibdat 100 ml.

**D. Pembuatan Hidrazin Sulfat (N<sub>2</sub>H<sub>6</sub>SO<sub>4</sub>) 0,5M sebanyak 100 ml**

$$M = \frac{n}{V} = \frac{\text{mol}}{L}$$

$$0,5 \text{ M} = \frac{n}{0,1}$$

$$n = 0,5 \text{ M} \times 0,1 \text{ L} = 0,05 \text{ mol}$$

$$n = \frac{m}{mr}$$

$$0,05 \text{ mol} = \frac{m}{130,11 \text{ gr/mol}}$$

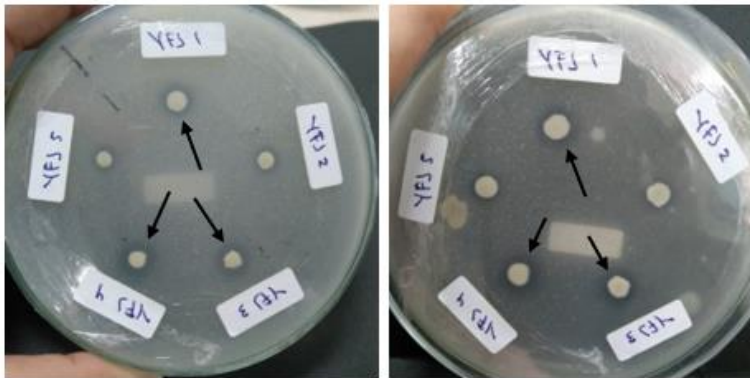
$$m = 0,05 \text{ mol} \times \frac{130,11 \text{ gr}}{\text{mol}}$$

$$m = 6,5055 \text{ gram}$$

~ dibutuhkan 6,5055 gram Hidrazin Sulfat (N<sub>2</sub>H<sub>6</sub>SO<sub>4</sub>) dan 100 mL air steril non fosfat

**Lampiran 3. Hasil Skrining Isolat Khamir Potensial Penghasil Fitase dari Biji Jagung (*Zea mays*) dengan Media Agar Selektif Fitase (PSMA)**

**A. Hasil zona bening yang terbentuk pada media PSMA**



**B. Tabel pengukuran diameter koloni dan zona bening**

Kode Isolat Khamir	Diameter Koloni		Rerata
	Pengulangan 1	Pengulangan 2	
YFJ-1	4,93	3,72	4,33
YFJ-2	3,91	3,8	3,86
YFJ-3	4,03	3,73	3,88
YFJ-4	4,02	3,86	3,94
YFJ-5	3,88	3,16	3,52

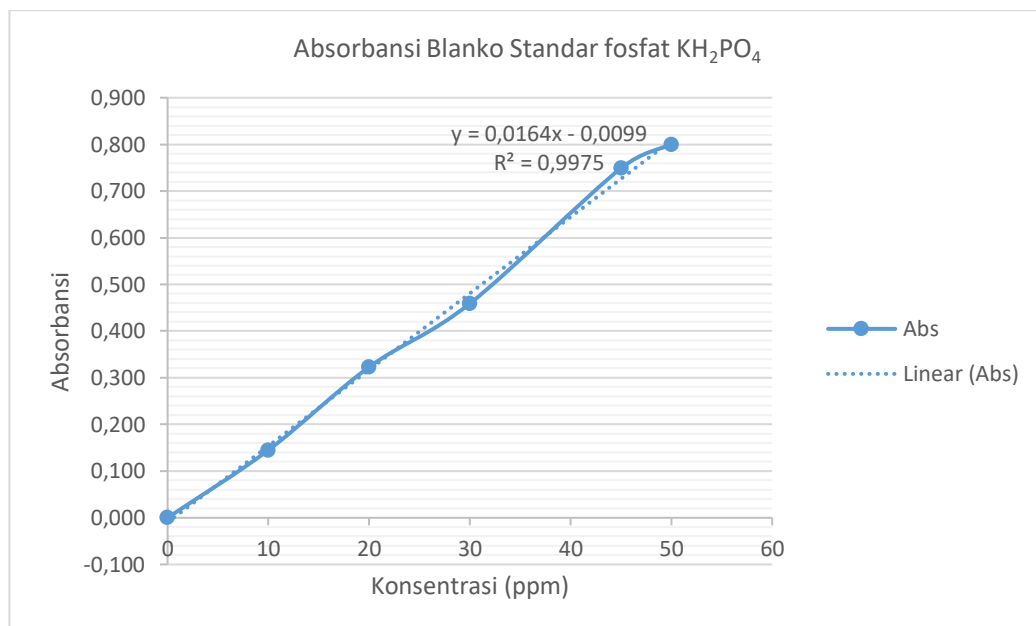
Kode Isolat	Diameter Zona Bening (mm)		Rerata (mm)	Zona Hidrolitik (mm)
	Pengulangan 1	Pengulangan 2		
YFJ-1	8,21	6,95	7,58	3,26
YFJ-2	6,06	5,85	5,96	2,10
YFJ-3	7,63	6,85	7,24	3,36
YFJ-4	7,89	7,37	7,63	3,69
YFJ-5	5,44	5,22	5,33	1,81

Zona hidrolitik = diameter zona bening (mm) – diameter koloni

#### Lampiran 4. Uji Aktivitas Fitase

##### A. Hasil Absorbansi larutan standar fosfat $\text{KH}_2\text{PO}_4$ dengan spektrofotometri $\lambda 700$ nm dan kurva standar yang terbentuk

Konsentrasi fosfat (ppm)	Rerata Absorbansi (ppm)
0	0,000
10	0,145
20	0,323
30	0,459
45	0,749
50	0,800



##### B. Hasil absorbansi sampel dengan spektrofotometri $\lambda 700$

Kode Isolat Khamir	Absorbansi 700nm		
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
YFJ-1	0,174	0,179	0,183
YFJ-3	0,318	0,321	0,329
YFJ-4	0,446	0,452	0,460

### C. Data aktivitas enzim fitase

Isolat	AE = $(C * F_p * 1000) / (t * B_M * Vol \text{ enzim})$			Rerata (U/mL)	Std. (U/mL)
	Ulangan 1 (U/mL)	Ulangan 2 (U/mL)	Ulangan 3 (U/mL)		
YFJ-1	3,777	3,880	3,962	3,873	0,093
YFJ-3	6,735	6,796	6,961	6,831	0,117
YFJ-4	9,364	9,487	9,651	9,501	0,144

### D. Data statistik fosfat bebas hasil degradasi fitat oleh fitase

#### 1. Uji normalitas data (Shapiro-Wilk)

	pertakuan	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Fosfat bebas	p1	,196	3	.	,996	3	,878
	p2	,282	3	.	,936	3	,510
	p3	,204	3	.	,993	3	,843

a. Lilliefors Significance Correction

Nilai signifikansi sampel > 0,05% menunjukkan bahwa data terdistribusi secara normal.

#### 2. Uji homogenitas

#### Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Fosfat bebas	Based on Mean	,292	2	6	,757
	Based on Median	,156	2	6	,859
	Based on Median and with adjusted df	,156	2	5,367	,860
	Based on trimmed mean	,281	2	6	,764

Nilai signifikansi data > 0,05% menunjukkan bahwa data bersifat homogen.

### 3. Uji anova

#### ANOVA

absorbansi700nm

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,113	2	,056	1657,529	,000
Within Groups	,000	6	,000		
Total	,113	8			

Nilai signifikasi data  $< 0,05$  menunjukkan bahwa data terdapat perbedaan dengan taraf 5%.

### 4. Uji lanjut duncan

#### absorbansi700nm

Duncan<sup>a</sup>

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
p1	3	,17867		
p2	3		,32267	
p3	3			,45267
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Nilai pada table duncan menunjukkan adanya perbedaan nyata dengan taraf 5% untuk setiap kelompok sampel.

## Lampiran 5. Hasil Pengujian Fermentasi Karbohidrat Selama 7 Hari

### A. Hasil fermentasi fruktosa

Nama Isolat Khamir	Ulangan													
	Hari ke-1		Hari ke-2		Hari ke-3		Hari ke-4		Hari ke-5		Hari ke-6		Hari ke-7	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
YFJ-1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
YFJ-3	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+
YFJ-4	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+
Kontrol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan: + = ada gelembung

- = tidak terdapat gelembung (Kurtzman & Fell, 1998)

No	Kode isolate	Indikator gelembung
1.	YFJ-1	
2.	YFJ-3	
3.	YFJ-4	

## B. Hasil fermentasi glukosa

Nama Isolat Khamir	Ulangan													
	Hari ke-1		Hari ke-2		Hari ke-3		Hari ke-4		Hari ke-5		Hari ke-6		Hari ke-7	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
YFJ-1	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
YFJ-3	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
YFJ-4	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
Kontrol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan: + = ada gelembung

- = tidak terdapat gelembung (Kurtzman & Fell, 1998)




No	Kode isolate	Indikator gelembung
1.	YFJ-1	
2.	YFJ-3	
3.	YFJ-4	

### C. Hasil fermentasi sukrosa

Nama Isolat Khamir	Ulangan													
	Hari ke-1		Hari ke-2		Hari ke-3		Hari ke-4		Hari ke-5		Hari ke-6		Hari ke-7	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
YFJ-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
YFJ-3	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+
YFJ-4	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
Kontrol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

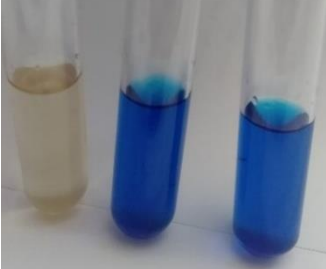
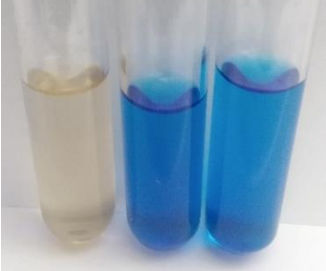
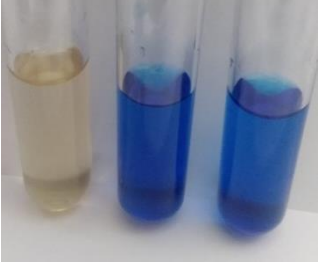
Keterangan: + = ada gelembung

- = tidak terdapat gelembung (Kurtzman & Fell, 1998)

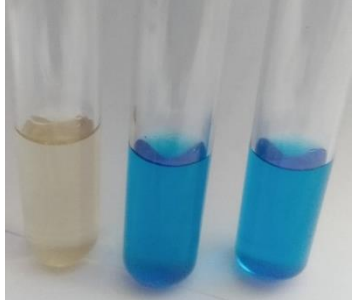
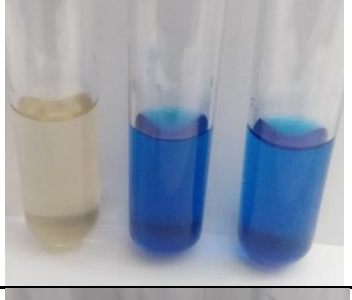
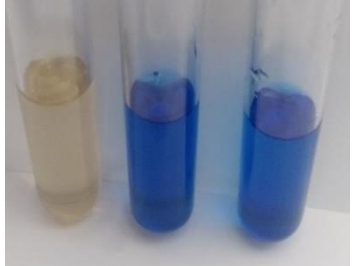
No	Kode isolat	Indikator gelembung
1.	YFJ-1	
2.	YFJ-3	
3.	YFJ-4	

## Lampiran 6. Hasil Uji Fosfat

### A. Uji Fosfat Fosfomolybdat dengan media *Pikovskaya broth*

No	Kode Isolat	Ulangan	Hasil	Reaksi Molybdat
1.	YFJ-1	1	Biru Tua	
		2	Biru Tua	
		Kontrol	Kuning cerah	
2.	YFJ-3	1	Biru Muda	
		2	Biru Muda	
		Kontrol	Kuning cerah	
3.	YFJ-4	1	Biru Tua	
		2	Biru Tua	
		Kontrol	Kuning cerah	

**B. Uji Fosfat Fosfomolybdat dengan media PSM (*Phytase Selective Medium*)**

No	Kode Isolat	Ulangan	Hasil	Reaksi Molybdat
1.	YFJ-1	1	Biru Tua	
		2	Biru Tua	
		Kontrol	Kuning cerah	
2.	YFJ-3	1	Biru Muda	
		2	Biru Muda	
		Kontrol	Kuning cerah	
3.	YFJ-4	1	Biru Tua	
		2	Biru Tua	
		Kontrol	Kuning cerah	



KEMENTERIAN AGAMA  
 UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG  
 FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
 PROGRAM STUDI BIOLOGI  
 Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp (0341) 558933, Fax. (0341) 558933

**KARTU KONSULTASI SKRIPSI**

Nama : Ayu Intan Safitri  
 NIM : 15620065  
 Program Studi : S1 Biologi  
 Semester : Genap TA 2021/2022  
 Pembimbing : Ir. Liliek Harianie AR, M.P  
 Judul Skripsi : Isolasi dan Karakterisasi Khamir  
 Potensial Penghasil Fitase dari Biji Jagung  
 (*Zea mays* L.)

No.	Tanggal	Uraian Kegiatan	TTD
1.	18/01/2021	Konsultasi Judul	
2.	22/01/2021	Revisi judul - BAB III	
3.	31/03/2021	Revisi BAB I - BAB III	
4.	10/04/2021	Revisi BAB I - BAB III	
5.	16/04/2021	Revisi BAB I - BAB III	
6.	15/07/2021	Revisi BAB I - BAB III	
7.	03/12/2021	Revisi BAB I - BAB III	
8.	02/02/2022	Revisi BAB I - BAB III	
9.	18/04/2022	Konsultasi BAB III dan BAB IV	
10.	25/04/2022	Konsultasi BAB IV	
11.	06/06/2022	Konsultasi BAB IV	
12.	08/06/2022	Konsultasi BAB I - IV dan AGC	

Pembimbing

Ir. Liliek Harianie AR, M.P  
 NIP. 19620901 199803 2



Dr. Evika Sandi Savitri, M.P  
 NIP. 197410182003122002



KEMENTERIAN AGAMA  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
JURUSAN BIOLOGI  
Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp./ Faks. (0341) 558933

**KARTU KONSULTASI AGAMA SKRIPSI**

Nama : Ayu Intan Safitri  
NIM : 15620065  
Program Studi : Biologi  
Semester : Genap T.A 2022  
Pembimbing : Dr. H. Ahmad Barizi M.A  
Judul Skripsi : isolasi dan Karakterisasi Khamir Potensial Penghasil Fitase Dari Biji Jagung  
(*Zea Mays* L.)

NO.	TANGGAL	URAIAN KONSULTASI	TTD PEMBIMBING
1.	29 Desember 2021	Konsultasi integrasi ayat BAB I	01
2.	2 Februari 2022	Konsultasi integrasi ayat BAB II dan III	01
3.	24 Mei 2022	Konsultasi integrasi ayat BAB IV	10
4.	2 Juni 2022	ACC integrasi BAB I, II, III, dan IV	11

Pembimbing Skripsi,

Dr. H. Ahmad Barizi M.A  
NIP. 197312121 99803 1 008



Malang, 13 Juni 2022

Ketua Program Studi,

Dr. Evika Sandi Savitri, M.P  
NIP. 19741018 200312 2 002



**KEMENTERIAN AGAMA  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA  
MALIK IBRAHIM MALANG  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
JURUSAN BIOLOGI**

Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp./ Faks.  
(0341) 558933

Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email:  
[biologi@uin-malang.ac.id](mailto:biologi@uin-malang.ac.id)

**Form Checklist Plagiasi**

**Nama** : Ayu Intan Safitri  
**NIM** : 15620065  
**Judul** : Isolasi dan Karakterisasi Khamir Potensial  
Penghasil Fitase dari Biji Jagung (*Zea mays*  
L.)

No	Tim Checkplagiasi	Skor Plagiasi	TTD
1.	Berry Fakhry Hanifa, M.Sc		
2.	Bayu Agung Prahardika, M.Si	24 %	
3.	Tyas Nyonita Punjungsari, M.Sc		

Mengetahui  
Ketua Program Studi Biologi  
  
**Dr. Evika Sandi Savitri, M. P**  
 NIP. 19741018 200312 2 002