

Potensi Bakteri Endofit Dari *Zea mays* L. Sebagai Penghasil Fitase

HAFSAN¹, NURHIKMAH¹, Y HARVIYANTI¹, EKA SUKMAWATY¹, ISNA RASDIANAH AZIZ¹, CUT MUTHIADIN¹, LAILY AGUSTINA², ASMUDDIN NATSIR², AHYAR AHMAD³.

¹Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin Makassar

Jl. H.M Yasin Limpo No. 36, Kab. Gowa, Sulawesi Selatan 92113

²Fakultas Peternakan, Universitas Hasanuddin

Jl. Perintis Kemerdekaan Km 10 Makassar, Sulawesi Selatan 90245

³Fakultas MIPA, Universitas Hasanuddin

Jl. Perintis Kemerdekaan Km 10 Makassar, Sulawesi Selatan 90245

Email: hafsan.bio@uin-alauddin.ac.id

ABSTRAK

Asam fitat ($C_6H_{18}O_{24}P_6$) merupakan senyawa kimia yang terdiri atas *inositol* dan *asam fosfat*, asam fitat merupakan senyawa yang selalu terdapat pada bahan pakan yang berasal dari tanaman sereal dan merupakan senyawa yang tidak dapat didigesti oleh ternak monogastrik, sehingga dibutuhkan enzim fitase yang dapat menghidrolisis asam fitat. Fitase (*myo-inositol heksakisfosfat fosfohidrolase*) adalah enzim yang dapat menghidrolisis ikatan fosfoester pada asam fitat, menghasilkan *fosfat* anorganik dan *ester fosfat*. Enzim fitase dapat dihasilkan oleh mikroorganisme, salah satunya adalah bakteri endofit. Bakteri endofit adalah mikroorganisme yang menguntungkan yang berinteraksi dengan tanaman inang tanpa menyebabkan gangguan atau kerusakan pada tanaman tersebut, pada penelitian ini bakteri endofit telah diisolasi dari tanaman jagung (*Zea mays*) yang digunakan sebagai sampel penelitian. Isolasi dilakukan dari masing-masing organ tanaman jagung (*Zea mays*) dan diseleksi menggunakan media selektif PSM (*Phytase Screening Media*). Empat isolat yang terpilih dari masing-masing organ berdasarkan IF (Indeks Fitatik) tertinggi kemudian diidentifikasi molekuler dan memperoleh hasil isolat akar 10^{-7} HF.7 (IF=1,365 cm) merupakan bakteri *Burkholderia lata*, batang 10^{-7} HF.2 (IF=1,095 cm) merupakan bakteri *Pantoea stewarti* subsp. *indologens*, daun 10^{-6} HF.3 (IF=1,36 cm) merupakan bakteri *Enterobacter ludwigi* dan biji 10^{-8} HF.1 (IF=0,98 cm) merupakan bakteri *Enterobacter cloacae*.

Kata Kunci: asam fitat, bakteri endofit, fitase, jagung (*zea mays*)

PENDAHULUAN

Asam fitat ($C_6H_{18}O_{24}P_6$) adalah bentuk utama penyimpanan fosfor dan merupakan senyawa antinutrisi pada bahan pakan unggas yang berbahan dasar tanaman biji-bijian dan sereal. Senyawa asam fitat bersifat *khelat* karena kemampuannya ion beberapa mineral seperti kalsium (Ca), besi (Fe), seng (Zn), magnesium (Mg), mangan (Mn) dan copper (Cu), serta protein. Bentuk kompleks asam fitat dan protein maupun kompleks dengan mineral bersifat tidak larut dan tidak dapat didigesti oleh ternak monogastrik, karena keterbatasan dalam menghasilkan enzim penghidrolisis asam fitat pada saluran pencernaan sehingga dapat menurunkan nilai nutrisi bahan pakan yang dikonsumsi.

Peningkatan efisiensi pemanfaatan unsur fosfor dan mineral lainnya yang terikat oleh fitat dan mengurangi pengaruh negatifnya terhadap utilisasi nutrisi lain dapat dilakukan dengan pemutusan ikatannya melalui proses hidrolisis oleh enzim fitase. Fitase (*myo-inositol heksakisfosfat fosfohidrolase*) adalah enzim yang dapat menghidrolisis ikatan fosfoester pada asam fitat, menghasilkan fosfat anorganik dan ester fosfat (Sari, 2013).

Fitase dapat diperoleh dari berbagai sumber, dewasa ini telah banyak diperoleh dari tanaman, kapang, bakteri maupun rumen ternak ruminansia. Bakteri sebagai sumber enzim memiliki nilai lebih dibandingkan dengan mengisolasi enzim dari hewan maupun tumbuhan antara lain karena sel bakteri relatif

lebih mudah dan cepat ditumbuhkan, produksi tidak tergantung oleh musim, serta mutunya lebih seragam. Oleh kenyataan tersebut, pencarian sumber enzim yang unggul seperti bakteri penghasil fitase sangat penting untuk menjadi perhatian. Hasil penelitian oleh Sajidan (2004), menunjukkan bahwa aktivitas spesifik fitase dari tanaman ternyata jauh lebih kecil dibanding fitase yang dihasilkan oleh mikroorganisme sehingga fitase yang berasal dari mikroorganisme semakin dapat diterima untuk diaplikasikan dalam produksi pakan.

Pemanfaatan fitase mikroorganisme telah dilaporkan dalam penelitian berbeda oleh Kusharyoto (2010), bahwa dalam produksi pakan ternak monogastrik sangat efektif dalam meningkatkan ketersediaan fosfor serta mengurangi polusi yang diakibatkan oleh pelepasan fitat ke lingkungan. Hingga saat ini beberapa enzim fitase dari strain bakteri berhasil diisolasi, dikloning, *disequencing* dan diekspresikan seperti enzim fitase dari beberapa mikroba misalnya *Escherichia coli*, *Bacillus sp.*, *B. amyloliquefaciens*, *Lactobacillus amylovorus*, *Selenomonas ruminantium*, *Klebsiella pneumonia*, *K. oxitoca*, *K. aerogenes* dan *K. terrigena* (Shimizu, 1992; Greiner *et al.*, 1993; Greiner *et al.*, 1997; Yanke *et al.*, 1999; dan Sajidan *et al.*, 2004).

Bakteri endofit sebagai salah satu kelompok bakteri unik yang memiliki habitat alami di dalam jaringan tanaman sangat menarik untuk dieksplorasi. Berbagai metabolit sekundernya telah coba dihasilkan dan diteliti serta dimanfaatkan dalam berbagai bidang, namun masih terbatas terkait pemanfaatannya dalam bidang peternakan. Potensi bakteri endofit tanaman *Zea mays* L. sebagai penghasil fitase didasarkan pada keberadaan asam fitat pada seluruh organnya, sehingga bakteri endofit yang berasosiasi dengan tanaman tersebut akan memproduksi fitase untuk memanfaatkan fosfor yang tersedia dalam bentuk asam fitat untuk kebutuhan metabolisme.

METODE PENELITIAN

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah organ tanaman jagung

(*Zea mays*) yang terdiri atas akar, batang, daun dan biji yang telah berumur 80-110 hari. Media Luria Bertani (LB), Air suling steril, Media *Phytase Selective Medium*, sepasang primer universal yang digunakan untuk semua jenis bakteri yaitu forward primer universal primer forward 63f dan primer reverse 1387r, template DNA, kit ekstraksi DNA (Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit), proteinase K, lysozyme, Gram (+) buffer, Gram (-) buffer, GB buffer, W1 buffer, wash buffer, elution buffer, etanol absolut 96%, Master Mix PCR Kit, Tris borate EDTA (TBE) 10x, DNA ladder 100 bp, loading dye, agarose, ddH₂O, ethidium bromide, sarung tangan dan masker, spirtus, alkohol 70%, alkohol 96%, *Natrium hipoklorit*, reagen pewarnaan gram bakteri *cristal violet*, iodine, aseton alkohol, safranin, *methylen blue*,

a. Isolasi dan Skrining Bakteri Endofit penghasil Fitase. Sampel yang digunakan yaitu tanaman jagung (*Zea mays*) yang terdiri atas akar, batang, daun dan biji jagung (*Zea mays*) yang berumur 80-110 hari. Sampel dibersihkan dengan air mengalir, kemudian disterilkan dengan direndam pada larutan *natrium hipoklorit* selama 2 menit, lalu etanol 70% selama 2 menit dan etanol 96% selama 2 menit. Selanjutnya masing-masing organ tanaman dibilas dengan air suling steril sebanyak 2 kali, sebagai kontrol sterilisasi hasil bilasan terakhir dari sampel, dikultivasi pada media, apabila tidak ada koloni yang tumbuh, maka koloni yang tumbuh dari sampel organ tanaman dapat dipastikan merupakan bakteri endofit. Masing-masing sampel digerus dengan *mortal and pastle*, dan sebanyak 10 gr, dikultivasi ke dalam media LB cair, diinkubasi selama 1 x 24 jam dengan *shaker incubator*. Hasil kultivasi diencerkan hingga pengenceran 10⁻⁸, tiga pengenceran terakhir diinokulasikan pada media LB lempeng agar pada suhu 37°C, 1 x 24 jam. Koloni yang tumbuh kemudian dimurnikan lalu diskriming pada media

selektif PSM pada suhu 37°C, 1 x 24 jam. Bakteri yang tumbuh dan membentuk zona bening disekeliling koloni pada media tersebut memiliki diindikasikan sebagai bakteri penghasil fitase. Isolat dengan indeks fitatik (nisbah antara diameter zona bening dan diameter koloni bakteri) tertinggi kemudian dipilih sebagai isolat terpilih untuk diidentifikasi.

b. Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri.

Isolat dengan indeks fitatik tertinggi, selanjutnya dikarakterisasi dengan pengamatan makroskopik dan mikroskopik serta uji biokimia. Pengamatan makroskopik meliputi pengamatan ukuran, pigmentasi, bentuk, elevasi, permukaan dan margin. Pengamatan mikroskopik meliputi pengamatan pewarnaan gram. Uji biokimia meliputi reaksi fermentasi karbohidrat, uji IMVIC (*Indol*, *Methyl Red*, *Voges-Proskauer*, *Simmon's sitrat*) dan uji katalase, uji pereduksi H₂S dan uji motilitas.

Identifikasi isolat terpilih dengan pendekatan molekuler dilakukan dengan penanda gen 16S rRNA. Ekstraksi DNA

bakteri menggunakan kit Geneaid. DNA diamplifikasi dengan menggunakan PCR Primer universal 63f dan *primer reverse* 1387r. Siklus PCR terdiri atas 3 tahap yaitu denaturasi, annealing dan extention. Tahap awal pre-denaturasi pada suhu 94°C selama 2 menit, selanjutnya denaturasi suhu 94°C selama 1 menit, annealing pada suhu 58°C selama 45 detik, ekstensi 72°C selama 90 detik sebanyak 35 siklus dilanjutkan dengan ekstensi akhir suhu 72°C selama 5 menit dan final hold pada suhu 4°C.

Hasil PCR diamati menggunakan alat elektroforesis dengan menggunakan marker 100 bp yang bertujuan untuk melihat pita-pita DNA dari sampel. Selanjutnya hasil elektroforesis *disequencing* untuk mengetahui susunan basa DNANYa untuk konstruksi pohon filogenetik berdasarkan *database* sekuens dari *gen bank*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi bakteri endofit tanaman jagung dari organ akar, batang, daun dan biji menghasilkan 21 isolat yang kemudian diskriming pada media selektif PSM dan diperoleh 10 iksolat yang dapat mengindikasikan menghasilkan fitase secara kualitatif. Indeks fitatik masing-masing isolat sebagaimana pada tabel 1.

Tabel 1. Indeks Fitatik Bakteri Endofit dari masing-masing organ *Zea mays* L.

Kode Isolat	Indeks Fitatik (IF)
Akar 10 ⁻⁶ HF.1	1,00
Akar 10 ⁻⁶ HF.5	1,09
Akar 10 ⁻⁷ HF.7	1,37
Batang 10 ⁻⁶ HF.2	0,90
Batang 10 ⁻⁷ HF.2	1,09
Daun 10 ⁻⁶ HF.2	1,21
Daun 10 ⁻⁶ HF.3	1,36
Biji 10 ⁻⁶ HF.1	0,95
Biji 10 ⁻⁶ HF.3	0,93
Biji 10 ⁻⁸ HF.1	0,98

Berdasarkan hasil penentuan indeks fitatik, isolat dari akar memiliki indeks fitatik tertinggi. Hal ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang memperoleh bakteri endofit penghasil fitase yang ditemukan pada akar tanaman, hal ini dipengaruhi oleh fisiologi akar tanaman. Akar tanaman berperan dalam

menyerap unsur hara dan secara alami mempunyai mekanisme yang khusus dalam hal penyebaran unsur hara (fosfor) yang berikatan dengan asam fitat tersebut untuk pertumbuhan tanaman. Asam fitat dihidrolisis untuk diserap sebagai fosfor sebelum memasuki batang dan daun. Kemampuan

mikroorganisme endofit dalam menghasilkan metabolit sekunder (enzim) sesuai dengan fisiologi tanaman inangnya (Radji, 2005).

Isolat penghasil fitase terpilih, yaitu isolat HF.7 memiliki karakteristik yaitu: berukuran sedang, bentuk *circular*, warna putih kekuningan, elevasi *raised*, tepian *entire* dan permukaan berkerut. Bentuk sel isolat terpilih adalah bulat dan bersifat Gram negatif.

Temuan ini sejalan dengan beberapa penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa bakteri-bakteri penghasil fitase umumnya berasal dari kelompok Gram negatif. Rangkaian uji biokimia serta karakteristik morfologi dan sifat Gram sel isolat mengarah pada ciri-ciri yang dimiliki oleh genus *Burkholderia*. Hasil uji biokimia terhadap isolat terpilih terlampir pada Tabel 2.

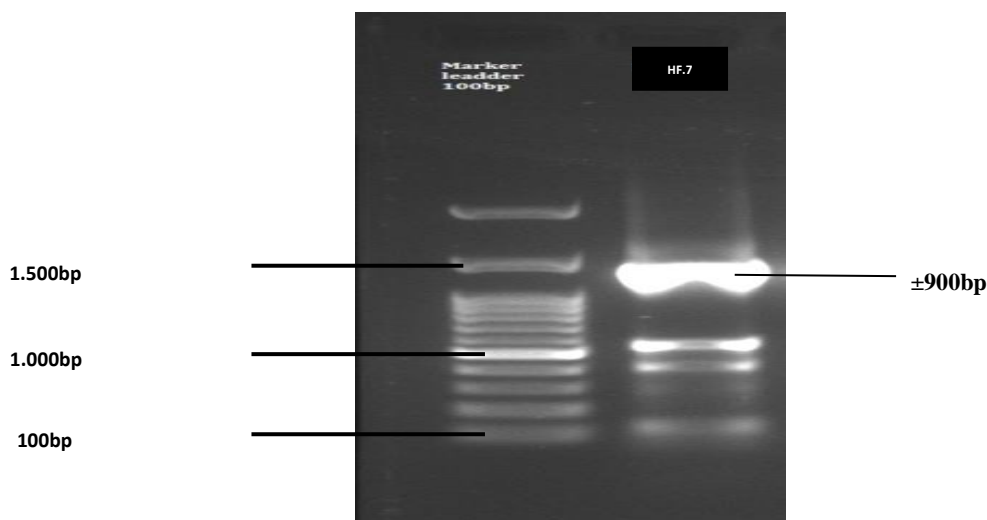
Tabel 2. Hasil uji biokimia isolat bakteri endofit *Zea mays* L. penghasil fitase terpilih

Uji Biokomia		Hasil Uji
Uji TSIA (<i>Triple Sugar Iron Agar</i>)		-
Uji H ₂ S		-
Uji Motilitas		-
Uji Katalase		+
Uji <i>Indol</i>		-
Uji <i>Methyl Red</i>		-
Uji <i>Voges Paskeur</i>		-
Uji <i>Citrat</i>		+
Fermentasi Karbohidrat	Laktosa	-
	Manitol	+
	Glukosa	+
Genus		<i>Burkholderia</i>

Isolat bakteri bakteri endofit terpilih dengan kode HF.7 selanjutnya dideterminasi dengan menggunakan primer universal yaitu forward primer 63F dan reverse primer 1387R untuk sekuen 16S-rRNA. Gen 16S-rRNA dianalisis secara lengkap di 1st BASE sequencing INT Malaysia. Analisis cluster pada sekuens tersebut dilakukan dengan

program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) dari NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) secara online pada website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

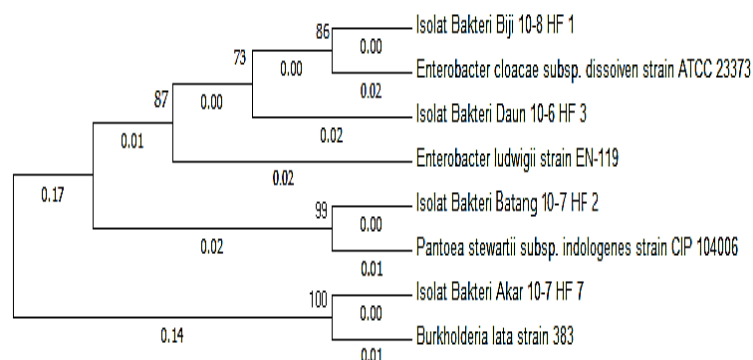
Adapun hasil elektroforesis dari produk amplifikasi gen 16S-rRNA adalah sebagai berikut:



Gambar 1. Hasil Elektroforesis produk amplifikasi gen 16S-rRNA isolat HF.7

Berdasarkan hasil kemiripan sekuens dengan sekuens pada gen bank menunjukkan bahwa isolat Akar 10⁻⁷ HF.7 memiliki kesamaan 99% dengan *Burkholderia lata*. Kumpulan sekuens yang telah *dialignment* kemudian digunakan untuk konstruksi pohon filogenetik agar menunjukkan hubungan kekerabatan antara bakteri-bakteri penghasil fitase lainnya. Hasil analisis filogenetik menggunakan sekuens DNA pengkode 16S-rRNA seperti yang terlihat pada gambar 3, diketahui bahwa isolat 10⁻⁷ HF.7 memiliki

hubungan kekerabatan paling dekat dengan *Burkholderia lata* strain 383 dengan jarak genetik 0,01 (dekat) dan nilai *bootstrap* 100 dibandingkan dengan bakteri jenis lainnya yang ada di *Gen Bank*. Nilai *bootstrap* merupakan nilai yang digunakan untuk menguji seberapa baik set data model yang kita gunakan. Jika nilai *bootstrap* rendah, maka sekuens seharusnya dikeluarkan dari analisis untuk mendapatkan sebuah pohon filogeni yang dapat dipercaya (Dharmayanti, 2011).



Gambar 3. Pohon filogeni kelompok isolat bakteri penghasil fitase dengan metode *neighbor-joining* berdasarkan hasil analisis 16S-rRNA.

Bakteri Genus *Burkholderia* telah dilaporkan bertindak sebagai salah satu bakteri endofit penting pada tanaman padi, jagung dan tebu (Manzila, 2015). Genus *Burkholderia* juga telah dilaporkan dapat menghasilkan enzim fitase dalam penelitian (Graminho *et al*, 2015) yang menyatakan berdasarkan analisis biokimia dan genetik mengungkapkan bahwa bakteri dari genus *Burkholderia* termasuk bakteri yang dapat menghasilkan fitase.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil skrining bakteri endofit *zea mays*, isolate dengan kode HF.7, secara kualitatif memiliki kemampuan menghasilkan fitase dan memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai sumber fitase yang unggul. Karakterisasi secara morfologi dan biokimia mengarahkan isolate tersebut ke dalam genus *Burkholderia*. Identifikasi molekuler dengan analisis 16S-rRNA

menunjukkan bahwa isolat HF.7 memiliki kesamaan 99% dengan *Burkholderia lata*.

DAFTAR PUSTAKA

- Amelia, Roawita. 2010. Karakterisasi Isolot Bakteri Penghasil Fitase Asal Kulu Jagung (*Sitophilus zeamays*) [Tesis]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Barabara J.E.S. and Christine J. C. B. 2006. "What Are Endophytes in Microbial Root Endophytes". (Eds: Thomas N.Sieber) Springer-Verlag, Berlin. Hal. 387.
- Dharmayanti, N.L.P. Indi. 2011. Filogenetika Molekuler: Metode Taksonomi Organisme Berdasarkan Sejarah Evolusi. *Makalah Wartazoa*. 21 No. 1: 1-10.
- Evy Novita Sari, Sajidan, Sugiyarto. 2013. Identifikasi Bakteri Penghasil Fitase dan Karakterisasi Fitase dari Kawah Sikidang Dieng. *El-Vivo. (Online)*. 1 No.1: 13-23.