

Isolasi dan Karakterisasi Fitase dari Mikroba yang Terdapat pada Pupuk Kompos, Rumen Sapi, Ragi dan Tanah Sawah

Sajidan¹, A.M.P. Nuhriawangsa², S.Z. Fadhilah¹, E. Erikawati¹ dan D. Iryani¹

¹Program Studi Biologi, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, ²Program Studi Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret Jl. Ir. Sutami 36A, Surakarta 57126

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi fitase dari berbagai sumber yang diasumsikan kaya akan senyawa fosfat kompleks seperti pupuk kompos, isi rumen sapi dan ragi. Isolasi bakteri penghasil fitase dilakukan dengan menggunakan media LB (*Luria Bertani*) dengan inkubasi pada suhu 37 °C selama 16 jam, sedangkan isolasi mikrobia dari ragi menggunakan media PDA (*Potato Dextrose Agar*). Ekstrak enzim kasar pada supernatan diperoleh dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 5.000 rpm selama 5 menit. Ekstrak enzim kasar dikarakterisasi secara fisik meliputi pH dan temperatur optimum dan pengaruh efektor logam terhadap aktivitas enzim relatif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat B1 dari kompos P88 mempunyai aktivitas relatif optimum pada pH 5, suhu 50 °C dan dengan aktifator Zn²⁺ pada konsentrasi 10⁻³ M dan 10⁻⁴ M. Isolat B2 dari rumen sapi mempunyai aktivitas relatif optimum pada pH 5, suhu 50 °C dan dengan aktifator Zn²⁺ pada konsentrasi 10⁻³ M dan Mg²⁺ pada konsentrasi 10⁻⁴ M. Isolat B3 dari ragi kecap mempunyai aktivitas relatif optimum pada pH 5, suhu 60 °C dan dengan aktifator Mg²⁺ pada konsentrasi 10⁻³ M dan Fe²⁺ pada 10⁻⁴ M dan B4 dari ragi tempe mempunyai aktivitas relatif optimum pada pH 5, suhu 50 °C dan dengan aktifator Mg²⁺ pada konsentrasi 10⁻³ M dan Ca²⁺ pada konsentrasi 10⁻⁴ M.

Kata kunci: fitase, pH optimum, temperatur optimum, efektor logam, isolat

Isolation and Characterization of Microbial Phytase from Compost, Cattle Rumen, Yeast and Rice Field

ABSTRACT

This research was aimed to isolate and characterize phytase from different sources of higger phosphat complex compounds (compost, cattle rumen, and yeast). Bacteria of phytase was isolated on Luria Bertani (LB) medium and it was incubated on 37 °C for 16 hours. Microbe from yeast was isolated on Potato Dextrose Agar (PDA) medium. Crude enzyme from supernatant was extracted with centrifuge on 5.000 rpm for 5 minutes. Crude enzyme was characterized for optimum pH, temperature, and influence of metal ion efector on relative activity of enzyme. B1 isolate from P88 compost had optimum relative activity on pH 5, temperature 50 °C and activator Zn²⁺ (10⁻³ and 10⁻⁴ M). B2 Isolate from cattle rumen had optimum relative activity on pH 5, temperature 50 °C and activator Zn²⁺ (10⁻³ M) and Mg²⁺ (10⁻⁴ M). B3 isolated from soy sauce yeast had optimum relative activity on pH 5, temperature 60 °C, and activators Mg²⁺ (10⁻³ M) and, Fe²⁺ (10⁻⁴ M). B4 isolated from tempeh yeast had optimum relative activity on pH 5, temperature 50 °C and activators Mg²⁺ (10⁻³ M) and Ca²⁺ (10⁻⁴ M).

Key words: *phytase, optimum pH, optimum temperature, metalo ion efector, isolate.*

PENDAHULUAN

Fitase merupakan salah satu enzim yang tergolong dalam kelompok *phosphatase* yang mampu menghidrolisis senyawa fitat (*myo-inositol (1,2,3,4,5,6) hexakisphosphates*) menjadi *myo*-inositol dan fosfat anorganik. Studi tentang fitase sangat pesat pada beberapa tahun terakhir karena enzim ini bermanfaat terutama sebagai campuran pakan ternak guna mereduksi senyawa fitat, sehingga pemanfaatan unsur fosfor dalam tubuh ternak non ruminansia menjadi optimal (Greiner *et al.*, 1997), serta guna mereduksi polusi unsur fosfor di lingkungan, sehingga *eutrofikasi* dipermukaan perairan dapat dicegah (Volfova *et al.*, 1994, dan Shin *et al.*, 2001).

Fitase dapat dijumpai pada tanaman, jaringan tubuh beberapa hewan dan mikroorganisme seperti jamur dan bakteri. Fitase dari mikroorganisme mulai diteliti secara intensif baik yang bertipe ekstraseluler dan intraseluler (Greiner *et al.*, 1993). Fitase dari tanaman sudah diisolasi dan dikarakterisasi berasal dari gandum, kedelai, jagung, rerumputan, bunga lili, padi-padian, kacang-kacangan dan wortel. Aktivitas spesifik fitase dari tanaman jauh lebih kecil dibanding fitase dari mikroorganisme (Sajidan, 2004).

Enzim mempunyai tipe tertentu dan memerlukan kondisi ideal untuk melaksanakan fungsinya (Applegate and Angel, 2004). Fitase yang dihasilkan dari bakteri dan jamur mempunyai perbedaan pH optima, ion metal yang disyaratkan, spesifitas substrat, mekanisme reaksi yang dimungkinkan dan temperatur (Wyss *et al.*, 1999).

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi mikroorganisme penghasil fitase yang terdapat pada pupuk kompos, isi rumen sapi dan ragi.

MATERI DAN METODE

Materi yang digunakan adalah pupuk kompos P88 yang berasal dari Boyolali, isi rumen diambil dari RPH Jagalan Surakarta, ragi kecap dan ragi tempe.

Isolasi menggunakan media padat dan peremajaan dengan media cair (Volk dan Wheeler, 1984). Ekstraksi enzim dengan menggunakan sentrifugasi berdasarkan berat molekul (Ismadi, 1987). Isolasi dengan mengambil cairan dari masing-masing sumber yang telah diencerkan dengan larutan Na fisiologis (isi cairan rumen dan pupuk kompos) dan ditanam pada media LB padat selama 16 jam pada suhu 37°C untuk mendapatkan bakteri dan PDA untuk menghasilkan jamur dari ragi yang akan diamati aktivitas fitasenya.

Inokulan bakteri dan jamur hasil isolasi diremajakan kembali pada media LB cair untuk bakteri dengan inkubasi selama 16 jam pada suhu 37°C dan media PDA cair untuk jamur selama 6 hari pada suhu 37°C. Media cair yang telah diinkubasi disentrifus dengan kecepatan 5.000 rpm selama 5 menit untuk mendapatkan ekstrak kasar enzim dari bakteri maupun jamur.

Ekstrak kasar enzim kemudian diuji aktivitas fitasenya dengan cara melihat aktivitasnya dalam mendegradasi ikatan fitat dengan melihat fosfat bebas hasil degradasi. Pengukuran aktivitas dengan metode: 25 µl enzim, 125 µl substrat (0,4 % Na-fitat dalam 100 mM Na-asetat) diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan larutan STOP (Larutan A: 2,352 g ammonium molibdat dalam 100 ml aquades ditambah 2 ml asam salpeter (HNO₃). Larutan B: 10 g ammonium metavanadat dalam 100 ml aquades ditambah 1 ml 25% NH₄OH. Larutan STOP: memcampur larutan A, larutan B, asam salpeter dan aquades dengan perbandingan = 1,5:1,5:1:2). Warna kuning dari fosfomolibdat diukur dengan spektrofotometer pada λ 415 nm (Sajidan, 2002).

Optimasi pH, temperatur dan pengaruh efektor logam diketahui dengan cara melihat aktivitas tertinggi pada berbagai level tersebut (Greiner *et al.*, 1997). pH diamati pada level 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, temperatur dengan pH optimum pada level 6°C, RT, 37, 40, 50, 60 dan 70°C, efektor logam dengan pH dan temperatur optimum pada level Zn²⁺ (ZnCl₂), Ca²⁺ (CaCl₂), Mg²⁺ (MgCl₂) dan Fe²⁺ (FeCl₂) dengan konsentrasi 10⁻³ dan 10⁻⁴ M. Aktivitas enzim

dihitung sebagai persen aktivitas relatif fitase dengan rumus (Absorbansi Terkoreksi Sampel x 100%) : Absorbansi Terkoreksi Tertinggi, dimana Absorbansi Terkoreksi adalah selisih dari Absorbansi Sampel dan Kontrol.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimasi pH

Hasil optimasi pH tampak pada Tabel 1. Optimum pH pupuk kompos P88, rumen sapi, ragi kecap dan ragi tempe adalah 5.

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh pH (Linder *et al.*, 1955). Pada kondisi maksimum maka pH enzim optimum (Suharsono, 1990). Enzim merupakan protein, dengan adanya perbedaan pH akan mempengaruhi aktivitasnya, sehingga terjadi perubahan ionisasi enzim pada S atau kompleks ES, sampai mencapai kestabilan (Reed, 1975). Fitase yang dihasilkan dari jamur, bakteri, tanaman dan hewan mempunyai aktivitas pH yang berlainan (Sajidan, 2004). Fitase dari jamur mempunyai aktivitas pH spesifik antara

2,5 sampai 7 (Wyss *et al.*, 1999). pH optimum fitase pada *E. coli* adalah 4,0 dan fitase *K. pneumoniae* sangat aktif pada pH 5 (Sajidan *et al.*, 2005). *E. Coli appA* stabil pada pH 2 sampai 10 (Golovan *et al.*, 2000). Aktivitas fitase tepung gandum diantara pH 5 sampai 6 dengan temperatur 40 sampai 55 °C (Bergman *et al.*, 2000).

Optimasi Temperatur

Hasil optimasi temperatur tampak pada Tabel 2. Temperatur optimum dari pupuk kompos P88, rumen sapi dan ragi tempe adalah 50°C dan ragi kecap 60°C.

Suhu meningkat dapat meningkatkan kecepatan reaksi enzim dan mencapai optimum, kemudian menurun secara tajam (Dionysius *et al.*, 1993). Pada kondisi ini gerakan molekul semakin meningkat, sehingga meningkatkan energi aktivasi yang menyebabkan zat yang bereaksi berada dalam keadaan terangsang, sehingga akan melemahkan ikatan tertentu dan akhirnya akan merubah S menjadi P (produk) (Soeharsono, 1990).

Tabel 1. Aktivitas relatif fitase (%) dari berbagai level pH pada isolat pupuk kompos P88 (B1), rumen sapi (B2), ragi kecap (B3) dan ragi tempe (B4) pada berbagai level pH.

Sumber	Level pH					
	3	4	5	6	7	8
B1	20,2	36,8	100	80,8	40,2	39,8
B2	33,2	39,1	100	67,9	61,6	60,5
B3	17,4	33,9	100	92,4	58,6	42,2
B4	30,3	44,2	100	93,6	64,7	51,2

Tabel 2. Aktivitas relatif fitase (%) dari berbagai level temperatur dari isolat pupuk kompos P88 (B1), rumen sapi (B2), ragi kecap (B3) dan ragi tempe (B4) pada berbagai level temperatur.

Sumber	Level Temperatur (°C)						
	6	28	37	40	50	60	70
B1	0	5,2	38,4	62,9	100	61,1	0
B2	87,4	88,7	90,4	92,1	100	97,9	39,7
B3	30,8	75,8	85,5	94,4	91,9	100	84,9
B4	65,1	72,8	80,8	81,9	100	83,8	78,6

Fitase mikrobial aktif pada suhu 35 sampai 63°C (Wodzinski and Ullah, 1996). Optimasi temperatur fitase *E. coli* pada suhu 50-55 °C sedangkan fitase *K. pneumoniae* pada suhu 45-50 °C (Sajidan *et al.*, 2005). *E. Coli appA* optimum pada suhu 60°C (Golovan *et al.*, 2000). Gen *phyA* yang dikloning ke *A. fumigatus* dan *A. niger* mampu bertahan pada suhu diatas 100°C selama 10 menit dengan pH 2,5 sampai 7,5 (Pasamontes *et al.*, 1997).

Optimasi Efektor Logam

Hasil optimasi efektor logam konsentrasi 10^{-3} M tampak pada Tabel 3. Optimasi efektor logam dari rumen sapi dan pupuk kompos P88 dihasilkan efektor Zn^{2+} dan ragi kecap dan ragi tempe Mg^{2+} .

Hasil optimasi efektor logam konsentrasi 10^{-4} M tampak pada Tabel 4. Optimasi efektor logam dari rumen sapi dihasilkan efektor Mg^{2+} , ragi kecap Fe^{2+} , ragi tempe Ca^{2+} dan pupuk kompos P88 Zn^{2+} .

Enzim mempunyai sifat karakteristik

dengan adanya sifat katalitik yang diatur oleh ion atau molekul. Ion atau molekul tersebut dapat membantu proses katalik (aktifator) dengan dapat berlangsungnya reaksi enzimatik. Selain itu ion atau molekul juga dapat bersifat kebalikannya (inhibitor) dengan menghambat sifat katalitik enzim (Rahayu, 1991). Enzim mempunyai sifat spesifik terhadap beberapa ion, baik bisa bersifat sebagai aktivator maupun inhibitor. Ada beberapa ion utama yang dapat meningkatkan proses katalitik enzim, diantaranya Fe^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} dan Mn^{2+} (Nelson dan Cox, 2000).

Penambahan Ca^{2+} dan Sr^{2+} pada konsentrasi 100 mM dalam Tris-HCl pH 7 meningkatkan aktivitas fitase dari *Bacillus amyloliquefaciens DS11* (Oh *et al.*, 2001). Penambahan Pb^{2+} sebanyak 5 mmol l^{-1} dapat meningkatkan aktivitas fitase tetapi penambahan Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} dan Hg^{2+} sebanyak 5 mmol l^{-1} menghambat aktivitas fitase (Yanke *et al.*, 1999). Aktivitas fitase tinggi jika ditambahkan ion Ca^{2+} dan Mg^{2+} (Maenz, 2001).

Tabel 3. Aktivitas relatif fitase (%) dari isolat pupuk kompos P88 (B1), rumen sapi (B2), ragi kecap (B3) dan ragi tempe (B4) pada level efektor logam 10^{-3} M.

Sumber	Level Efektor Logam (10^{-3} M)			
	Zn^{2+} ($ZnCl_2$)	Ca^{2+} ($CaCl_2$)	Mg^{2+} ($MgCl_2$)	Fe^{2+} ($FeCl_2$)
B1	100	40,1	97,4	72,3
B2	75,2	71,2	73,4	45,6
B3	58,5	56,2	100	24,9
B4	66,5	7,3	100	31,1

Tabel 4. Aktivitas relatif fitase (%) dari isolat pupuk kompos P88 (B1), rumen sapi (B2), ragi kecap (B3) dan ragi tempe (B4) pada level efektor logam 10^{-4} M.

Sumber	Level Efektor Logam (10^{-4} M)			
	Zn^{2+} ($ZnCl_2$)	Ca^{2+} ($CaCl_2$)	Mg^{2+} ($MgCl_2$)	Fe^{2+} ($FeCl_2$)
B1	100	30,7	68,9	90,2
B2	93,9	82,2	100	91,3
B3	-10,7	17,1	55,8	100
B4	-5,1	19,2	-11,8	-15,4

KESIMPULAN

Bakteri penghasil fitase dapat diisolasi dari pupuk kompos P88 dan isi rumen sapi. Jamur penghasil fitase dapat diisolasi dari ragi kecap dan ragi tempe. Pupuk kompos 88 mempunyai aktivitas fitase pH optimum 5, temperatur optimum 50 °C dan efektor logam 10^{-3} M dan 10^{-4} M adalah Zn^{2+} . Isi rumen sapi mempunyai aktivitas fitase pH optimum 5, temperatur optimum 50 °C dan efektor logam 10^{-3} M adalah Zn^{2+} dan 10^{-4} M adalah Mg^{2+} . Ragi kecap mempunyai aktivitas fitase pH optimum 5, temperatur optimum 60 °C dan efektor 10^{-3} M adalah Mg^{2+} dan 10^{-4} M adalah Fe^{2+} . Ragi tempe mempunyai aktivitas fitase pH optimum 5, temperatur optimum 50 °C dan efektor logam 10^{-3} M adalah Mg^{2+} dan 10^{-4} M adalah Ca^{2+} .

DAFTAR PUSTAKA

- Applegate, T. J. dan R. Angel 2004. Phytase: Basics of Enzyme Function. E-book: Farm Animal Management at Purdue. Departement of Animal Science. Purdue University.
- Bergman, E. L., K. Autio dan A. S. Sandberg, 2000. Optimal conditions for phytate degradation, estimation of phytase activity and localization of phytate in barley (Cv. blenheim). J. Agric. Food Chem. 48:4647-4655.
- Dionysius, D. A., K. S. Hoek, J. M. Milne dan S. L. Slatery, 1993. Trypsin-like enzyme from Sand Crab (Portunus pelagicus): Purification and characterization. J. Food Sci. 58:780-784.
- Golovan, S., G. Wang, J. Zhang dan C. W. Forsberg, 2000. Characterization and overproduction of the E. coli appA encoded bifunctional enzyme that exhibits both phytase and acid phosphatase activities. J. Can. Microbiol. 46:59-71.
- Greiner, R., E. Haller, U. Konietzny, and K.D. Jany. 1993. Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. Arch. Biochem. Biophys. 303: 107-113.
- Greiner, R., E. Haller, U. Konietzny, and K.D. Jany. 1997. Purification and characterization of a phytase from *Klebsiella terrigena*. Arch. Biochem. Biophys. 341: 201-206.
- Ismadi, H. M., 1987. Metoda Analisis Enzimatis. PAU Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Linder, M., Fanni, M. Parmentier, M. Sergent dan R. P. T. Luu, 1995. Protein recovery from veal bones by enzymatic hydrolysis. J. Food Sci. 60: 949-952.
- Maenz, D. D., 2005. Enzymatic Characteristic of Phytases as They Relate to Their Use in Animal Feeds. In E-Book: Enzyme in Animal Nutrition. M. R. Bedford dan G. G. Partridge, Eds. CABI Pub., UK.
- Nelson, D. L. dan M. M. Cox, 2000. Lehninger Principles of Biochemistry. 3rd ed. Worth Pub., New York.
- Oh, B. C., B. S. Chang, K. H. Park, N. C. Ha, H. K. Kim, B. H. Oh, and T. K., Oh, 2001. Calcium-Dependent Catalytic Activity of a Novel Phytase from *Bacillus amyloliquefaciens DS11*. J. Biochemistry. 40: 9669-9676.
- Pasamontes, L., M. Haiker, M. Wyss, M. Tessier dan Van Loon, 1997. Gene cloning, purification and characterization of a heat-stable phytase from fungus *A. fumigatus*. J. App. Envi. Microbiol. 63: 1696-1700.
- Rahayu, K., 1991. Teknologi Enzim. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Reed, G., 1975. Enzymes in Food Processing. Academic Press, New York.
- Sajidan. 2002. Molekulare Charakterisierung einer Phytase (Myo-inositol Hexakiphosphate Hydrolase) und von Phosphatasen aus Bakteriesolaten Indonesischer Reisfelder (*Klebsiella pneumoniae*). Dissertation. Institut fuer Biologie. Humboldt Universität zu Berlin. Deutschland (Germany).
- Sajidan, 2004. Aplikasi Enzim Fitase untuk Campuran Pakan Ternak Unggas. Dalam: Seminar Nasional Sosialisasi dan Promosi Hasil Penelitian. UNS, Surakarta.
- Sajidan, A.M.P. Nuhriawangsa dan A. Ratriyanto, 2004. Aplikasi Bakteri Penghasil Fitase (non rekombinan) pada Pakan Campuran Wheat Pollard terhadap Performan Ayam Broiler.

- Buletin Peternakan UGM . Vol. 28(3): 114-121.
- Sajidan, A. M. P. Nuhriawangsa dan A. Ratriyanto, 2005. Aplikasi *Escherichia coli* dan *Klebsiella pneumoniae* Penghasil Fitase dan Kombinasinya pada Pakan Campuran *Wheat Pollard* terhadap Performan Ayam Broiler. Dalam: *Prosiding Seminar Nasional Pengembangan Usaha Peternakan Berdaya Saing di Lahan Kering*. UGM, Yogyakarta: 186-192.
- Shin, S., N.C. Ha, B.C. Oh, T.K. Oh, and B.H. Oh. 2001. Enzyme mechanism and catalytic property of β propeller phytase. *Structure*. 9:851-858.
- Suharsono, 1990. *Enzimologi*. PAU Pangan dan Gizi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Volfova, O., J. Dvorakova, A. Hanzlikova dan A. Jandera, 1994. Phytase from *A. niger*. *J. Folia Microbiology*. 39:481-484.
- Volk W.A. dan M.F. Wheeler, 1984. *Basic Mikrobiologi*. Edisi ke-5. Penerjemah: Markham. Penerbit Erlangga, Jakarta.
- Whyss., M., R. Brugger, A. Kronenbegger, R. Remy, R. Fimbel, G. Oesterhelt dan M. Lehmann, 1999. Biochemical characterization of fungal phytase (myo-inositolhexakisphosphat phosphohydro-lase: Catalytic properties. *J. App. Environ. Microbiology*. 65:367-373.
- Yankee, L. J., L. B. Selinger, and K. J. Cheng, 1999. Phytase activity of *Selenomonas ruminantium*: a preliminary characterization. *J. App. Microbiology*. 29: 20-25.