

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

Sajidan

Program Studi Biologi FKIP, Universitas Sebelas Maret, Surakarta
Jl. Ir. Sutami 36 A, Ketingan, Surakarta

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 mikrobia dari 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 Zn^{2+} pada konsentrasi 10^{-3} M dan 10^{-4} , Isolat B2 dari rumen sapi mempunyai aktivitas relatif optimum pada pH 5, suhu 50°C dan dengan aktifator Zn^{2+} pada konsentrasi 10^{-3} M dan Mg^{2+} pada konsentrasi 10^{-4} M. Isolat B3 dari ragi kecap mempunyai aktivitas relatif optimum pada pH 5, suhu 60°C dan dengan aktifator Mg^{2+} pada konsentrasi 10^{-3} M dan Fe^{2+} pada 10^{-4} M dan B4 dari ragi tempe mempunyai aktivitas relatif optimum pada pH 5, suhu 50°C dan dengan aktifator Mg^{2+} pada konsentrasi 10^{-3} M dan Ca^{2+} pada konsentrasi 10^{-4} M.

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

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 telah dapat diisolasi dan dikarakterisasi berasal dari gandum, kedelai, jagung, rerumputan, bunga lili, padi-padian, kacang-kacangan dan wortel. Aktivitas spesifik fitase dari tanaman ternyata 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 yang dijual di pasar tradisional.

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: mencampur 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

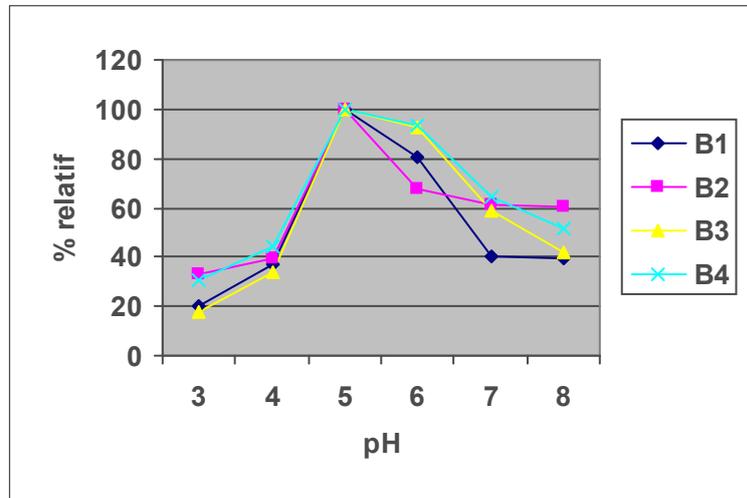
Hasil optimasi pH tampak pada Gambar 1. pH optimum dari pupuk kompos P88, rumen sapi, ragi kecap dan ragi tempe adalah 5.

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 – 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).



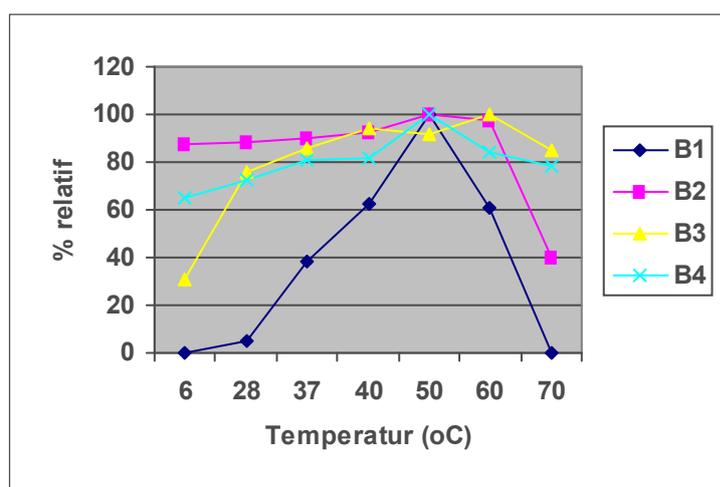
Gambar 1. Hasil Aktivitas Relatif Fitase (%) dari Berbagai Level pH pada Isolat Pupuk Kompos P88 (B1), Rumen Sapi (B2), Ragi Kecap (B3) dan Ragi Tempe (B4)

Optimasi Temperatur

Hasil optimasi temperatur tampak pada Gambar 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 optima, 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).



Gambar 2. Hasil Aktivitas Relatif Fitase (%) dari Berbagai Level Temperatur dari Isolat Pupuk Kompos P88 (B1), Rumen Sapi (B2), Ragi Kecap (B3) dan Ragi Tempe (B4)

Fitase mikrobial aktif pada suhu 35 sampai 63°C (Wodzinski and Ullah, 1996). Optimasi temperatur fitase *E. coli* pada suhu 50-55 °C dan 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).

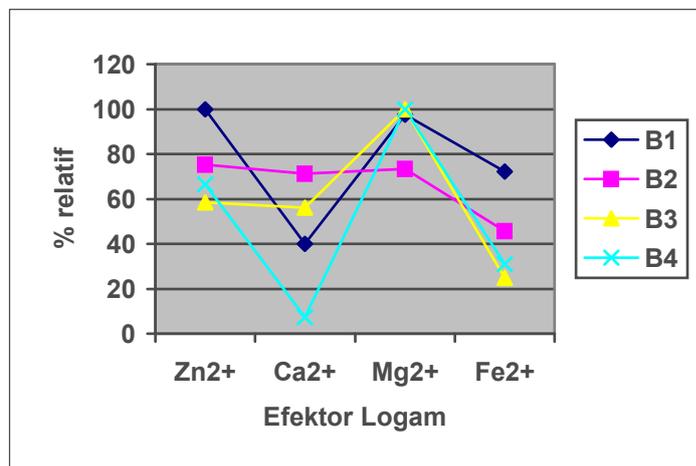
Optimasi Efektor Logam

Hasil optimasi efektor logam konsentrasi 10⁻³ M tampak pada Gambar 3. Optimasi efektor logam dari rumen sapi dan

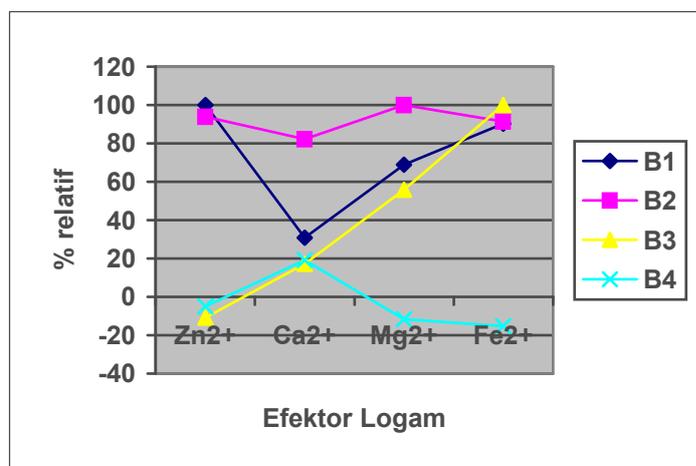
pupuk kompos P88 dihasilkan efektor Zn²⁺ dan ragi kecap dan ragi tempe Mg²⁺.

Hasil optimasi efektor logam konsentrasi 10⁻⁴ M tampak pada Gambar 4. Optimasi efektor logam dari rumen sapi dihasilkan efektor Mg²⁺, ragi kecap Fe²⁺, ragi tempe Ca²⁺ dan pupuk kompos P88 Zn²⁺.

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).



Gambar 3. Hasil Aktivitas Relatif Fitase (%) dari Berbagai Level Efektor Logam dari Isolat Pupuk Kompos P88 (B1), Rumen Sapi (B2), Ragi Kecap (B3) dan Ragi Tempe (B4)



Gambar 4. Hasil Aktivitas Relatif Fitase (%) dari Berbagai Level Efektor Logam dari Isolat Pupuk Kompos P88 (B1), Rumen Sapi (B2), Ragi Kecap (B3) dan Ragi Tempe (B4)

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 dapat meningkatkan aktifitas 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 akan tinggi jika ditambahkan ion Ca^{2+} dan Mg^{2+} (Maenz, 2001).

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 & efektor logam 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 @ Purdue*. Departement of Animal Sci. 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. Slattery, 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, dan 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, dan 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., United Kingdom.
- 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, dan 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 Bakterienisolaten Indonesischer Reisfelder (*Klebsiella pneumoniae*). *Dissertation*. Institut fuer Biologie. Humboldt Universitat 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. Bull. Peternakan UGM. 28(3): 114-121.
- Sajidan, A. M. P. Nuhriawangsa dan A. Ratriyanto, 2005. Aplikasi *Eschericia coli* dan *Klebsiella pneumoniae* Penghasil Fitase dan Kombinasinya pada Pakan Campuran *Wheat Pollard* terhadap Performan Ayam Broiler. Dalam: Proc. Seminar Nasional Pengembangan Usaha Peternakan Berdaya Saing di Lahan Kering. Dalam Rangka Dies Natalis UGM, Yogyakarta. Edisi Juni. Hal: 186-192.
- Shin, S., N.C. Ha, B.C. Oh, T.K. Oh, dan 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 Mikrobiology*. 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 phosphohydrolase: Catalytic properties. J. App. Enviro. Microbiology. 65:367-373.
- Yankee, L. J., L. B. Selinger dan K. J. Cheng, 1999. Phytase activity of *Selemonas ruminantium*: a preliminary characterization. J. App. Microbiology. 29: 20-25.