

PENGARUH SUHU DAN pH TERHADAP AKTIVITAS ENZIM FOSFATASE BAKTERI TERMOFILIK SUNGAI GENDOL PASCA ERUPSI MERAPI

The INFLUENCE of TEMPERATURE and pH TOWARD the ACTIVITY of the PHOSPHATASE ENZYME FROM THERMOPHILIC BACTERIA of GENDOL RIVER PASCA MERAPI ERUPTION

Oleh: Nurkhotimah¹, Biologi, FMIPA, UNY, Nurkhotimah_xia2@yahoo.com,
Evy Yulianti, M.Sc², evy_yulianti@uny.ac.id ; Anna Rakhmawati, M.Si³,
anna_rakhmawati@uny.ac.id
¹mahasiswa biologi UNY
^{2,3} dosen biologi UNY

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh suhu dan pH terhadap aktivitas enzim fosfatase bakteri termofilik Sungai Gendol pasca erupsi Merapi dan untuk mengetahui berapa suhu dan pH optimal untuk aktivitas enzim fosfatase bakteri termofilik sungai gendol pasca erupsi merapi. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen dengan 2 perlakuan yaitu variasi pH dan variasi suhu. Sampel ditumbuhkan pada suhu 55 °C dan pada pH 7, setelah mencapai fase eksponensial yaitu jam ke 24, dilakukan pemanenan enzim yaitu dengan cara disentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 20 menit, diambil supernatannya, ditambahkan substrat Ca₃PO₄ dan larutan buffer pH (5, 7, dan 9) diinkubasi pada perlakuan variasi suhu (45 °C, 55 °C, dan 65°C) selama 30 menit dan ditambahkan reagen. Data yang terhimpun berupa nilai absorbansi produk yang diperoleh dari hasil pengukuran menggunakan alat spektrofotometer, setelah itu dimasukkan ke rumus dan diperoleh hasil aktivitas enzim fosfatase Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas enzim fosfatase paling baik pada suhu 65 °C dan pH 7 untuk isolat D75, D92, dan D110a.

Kata kunci : Bakteri Pelarut Fosfat, bakteri termofilik, produk, aktivitas enzim, suhu, pH.

Abstract

This research aims were to know the influence of temperature and pH to the activity of the phosphatase enzyme of thermophilic bacteria of Gendol river in Merapi's post eruption and to find out how the temperature and the optimum pH for the phosphatase enzyme activity of thermophilic bacteria of Gendol river in Merapi's post eruption. This research was experimental research with two treatments, those are variation of pH and temperature. The samples were grown on 55 °C of temperature and 7 pH and after reaching the exponential phase, i.e. 24 hours the enzyme were harvested do with ways to speed 1000 rpm centrifuged for 20 minutes, taken supernatan, added Ca₃PO₄ substrate and buffer solution pH (5, 7, and 9) and being incubate treated some variations of temperature (45 °C, 55 °C, and the 65°C) for 30 minutes and added reagents.. The data phosphatase enzyme activity was obtained by measurement using spectrophotometer. The result of the research showed that the best activity of phosphatase enzyme was on 65 °C temperature and 7 pH for isolates D75, D92, and D110a..

Key words: phosphate solvent bacteria, thermophilic bacteria , enzyme activity, temperature, pH.

PENDAHULUAN

Unsur fosfor (P) adalah unsur esensial kedua setelah N yang berperan penting dalam fotosintesis dan perkembangan akar. Sebagian besar bentuk fosfat terikat oleh koloid tanah sehingga tidak tersedia bagi tanaman. Pengikatan-pengikatan fosfat tersebut menyebabkan pupuk fosfat yang diberikan tidak efisien. Salah satu alternatif untuk meningkatkan efisiensi pemupukan fosfat dalam mengatasi rendahnya fosfat tersedia dalam tanah adalah dengan memanfaatkan kelompok mikroorganisme pelarut fosfat, yaitu mikroorganisme yang dapat melarutkan fosfat tidak tersedia menjadi tersedia sehingga dapat diserap oleh tanaman (Taha (1969) *dalam* Simanungkalit (2000:142))

Erupsi Gunung Merapi tahun 2010 salah satu dampak positifnya yaitu ditemukannya bakteri termofilik oleh Penelitian yang dilakukan Anna Rahmawati dan Evy Yulianti, bakteri tersebut mengandung enzim amilase, protease, dan selulase. Penelitian tahun 2016 didapatkan hasil bahwa bakteri termofilik tersebut juga mengandung enzim Fosfatase.

Aktivitas enzim bergantung pada konsentrasi enzim dan keadaan reaksi seperti pH dan suhu (Wibraham & Michael, 1992: 247). Menurut Lehninger (1982: 240-252) faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim selain konsentrasi enzim, adalah suhu, pH substrat, inhibitor, dan aktivator. Hal ini dikarenakan setiap enzim memiliki pH dan suhu optimum. Menurut Sadikin, (2002:138) *dalam* Iswendi, (2009:5), jika suhu di bawah suhu optimum, maka aktivitas enzim akan rendah. Demikian juga dengan pH, jika dilakukan proses di

bawah pH optimum maka aktivitas enzim rendah. Hal ini terjadi karena struktur tiga dimensi enzim mulai berubah, sehingga substrat tidak dapat berikatan dengan sisi aktif enzim akibatnya proses katalis tidak dapat berlangsung secara sempurna. Masing-masing mikroorganisme memiliki sifat-sifat khusus dan kondisi lingkungan optimal berbeda yang mempengaruhi aktivitas enzim fosfatase. Maka dari itu perlu adanya penelitian tentang Pengaruh suhu dan pH terhadap aktivitas enzim fosfatase bakteri termofilik Sungai Gendol pasca erupsi merapi.

METODE PENELITIAN

Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimen dengan pemberian perlakuan suhu dan pH berbeda terhadap aktivitas enzim fosfatase.

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari - April 2017 dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi, FMIPA, Universitas Negeri Yogyakarta.

Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi dari penelitian ini adalah seluruh enzim yang diisolasi dari isolat bakteri pelarut fosfat yang diisolasi dari sampel isolat bakteri termofilik Sungai Gendol Atas pasca erupsi Merapi 2010 yang memiliki kemampuan melarutkan fosfat ditandai dengan zona bening yang terbentuk pada media. Sampel dari penelitian ini adalah enzim fosfatase dari isolat Bakteri Pelarut Fosfat (BPF) D75, D92, D110a terpilih dari isolat bakteri termofilik Sungai Gendol Atas pasca erupsi Merapi 2010.

Prosedur Penelitian

Media yang digunakan terdiri atas *Nutrient Agar*, *Nutrient Broth*, dan Media *Pikovskaya*. Bakteri diremajakan pada media NA, lalu untuk membuat starter bakteri yang berumur 24 jam ditumbuhkan pada media NB sampai OD \pm 1 yang diukur menggunakan spektrofotometer panjang gelombang 600 nm, lalu dipindah ke media *Pikovskaya* cair

Isolasi enzim fosfatase

Isolat terpilih sebanyak 5 mL (10% dari medium) ditumbuhkan di waterbath shaker pada medium *Pikovskaya*, sampai masa eksponensial pada suhu 55 °C. Kemudian disentrifugasi kultur bakteri penghasil enzim fosfatase dengan kecepatan 1000 rpm selama 20 menit. Lalu supernatan yang dihasilkan dituang ke dalam tabung.

Pengukuran aktivitas enzim fosfatase

Satu milliliter supernatan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Lalu tambahkan substrat kalsium fosfat 0,1 % (, dan 1 ml larutan buffer (pH: 5, 7, dan 9).

$$\text{Substrat : } \frac{0,1 \text{ gram}}{100 \text{ ml}} = \frac{100 \text{ mg}}{100 \text{ ml}} = 1 \text{ mg/ml}$$

Kemudian diinkubasi dalam inkubator selama 30 menit untuk setiap perlakuan suhu (45 °C, 55 °C, 65 °C). Lalu Satu unit aktivitas enzim fosfatase didefinisikan sebagai banyaknya fosfat tak terlarut (Ca_3PO_4) yang terhidrolisis menjadi posfat terlarut selama masa inkubasi 30 menit. Setelah diinkubasi, kemudian ditambahkan reagen (campuran larutan A,B,C, dan D) 0,5 ml dan mengocok dengan vortex. Selanjutnya absorbansi diuji dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 880 nm. Kemudian kontrol dibuat dengan prosedur yang sama

pada sampel, tetapi penambahan 1 ml substrat tidak dilakukan

Pembuatan larutan standar fosfat

Pipet 0 mL; 0.5 mL; 1 mL; 2 mL; 2.5 mL larutan baku fosfat yang mengandung 10 ppm dan masukan masing-masing kedalam labu ukur 25 ml. Ditambahkan air suling sampai tepat pada tanda tera kemudian dihomogenkan sehingga diperoleh kadar fosfat 0.0 ppm; 0.2 ppm ;0.4 ppm; 0.8 ppm dan 1.0 ppm.

Pembuatan reagen

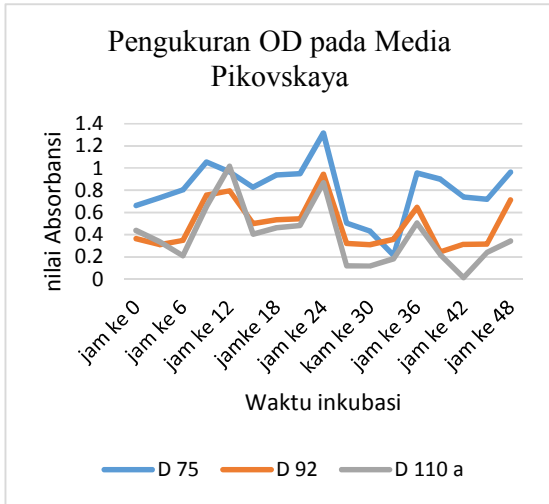
Pada uji pelarutan fosfat pada media *pikovskaya* cair dilakukan dengan pembuatan reagen meliputi. Pembuatan larutan A (H_2SO_4 5N sebanyak 14 mL diencerkan dalam dengan aquades, sehingga volumenya menjadi 100 mL). Pembuatan larutan B ($(\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O})$ sebanyak 0,324 gram dilarutkan dalam akuades, sehingga volumenya menjadi 100 ml). Pembuatan larutan C ($(\text{NH}_4)_2\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ sebanyak 4 gram dilarutkan dalam akuades, sehingga volumenya menjadi 100 mL). Pembuatan larutan D (Melarutkan 1,76 g Asam askorbat dalam akuades, sehingga volumenya menjadi 100 mL). Kemudian Mencampurkan reagen tersebut dengan mengambil 10 mL larutan A + 1 mL larutan B + 3 mL larutan C + 6 mL larutan D, lalu mengocok hingga homogen..

Analisis Data

Data kuantitatif hasil uji aktivitas enzim fosfatase dianalisis menggunakan aplikasi SPSS uji *Analysis of Variance* (ANOVA). Apabila terdapat perbedaan nyata atau sangat nyata dilanutkan dengan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) untuk melihat perlakuan antar kelompok perlakuan yang dibuat.

HASIL DAN PEMBAHASAN.

Fase eksponensial pada Medium



Pikovskaya

Gambar 3. Kurva Pertumbuhan Isolat Bakteri Termofilik Penghasil Enzim Fosfatase pada Medium Pikovskaya.

Menentukan eksponensial yaitu dengan melihat pada jam keberapa kenaikan nilai OD yang tertinggi atau kerapatan selnya paling banyak yang artinya produksi enzim mencapai jumlah maksimal. Grafik tersebut menunjukkan bahwa pada jam ke 24, jumlah OD tertinggi, sehingga pada waktu tersebut merupakan waktu inkubasi yang efektif untuk melakukan panen enzim dari kultur bakteri karena dimungkinkan enzim fosfatase sedang diproduksi dengan kecepatan tertinggi dan dalam jumlah yang banyak.

Uji aktivitas enzim fosfatase

Tabel 2. Nilai Absorbansi Kadar Fosfat Isolat pada Media Pikovskaya Ca₃(PO₄)₂

Iso lat	Suhu (°C)	Nilai Absorbansi		
		45	55	65
D 75	5	0,317	0,232	0,144
	7	0,621	0,112	0,737
	9	0,584	0,249	0,267
D 92	5	0,316	0,306	0,058
	7	0,496	0,351	0,981
	9	0,885	0,317	0,214
D 110 a	5	0,379	0,250	0,454
	7	0,513	0,442	0,953
	9	0,864	0,189	0,172

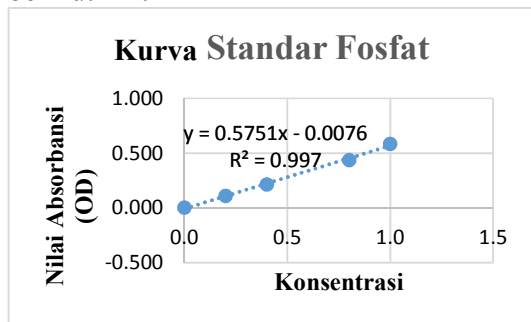
Keterangan : angka tebal: paling tinggi nilai absorbansinya.

Setelah mendapatkan nilai absorbansi, langkah selanjutnya yaitu mencari konsentrasi fosfat pada perlakuan dengan membuat kurva standar fosfat terlebih dahulu untuk menentukan persamaan rumusnya. Kurva standar fosfat ini didapatkan dengan memasukan hasil nilai absorbansi fosfat berbagai macam konsentrasi. Nilai absorbansi fosfat tersebut adalah sebagai berikut :

Tabel 3. Nilai Absorbansi Fosfat Berbagai Konsentrasi

Konsentrasi fosfat (gr/ml)	Nilai absorbansi
0,0	0,0
0,2	0,109
0,4	0,213
0,8	0,436
1,0	0,584

Tabel 3 merupakan nilai absorbansi fosfat terlarut hasil pengukuran kadar fosfat untuk menentukan kurva standar fosfat, data tersebut disajikan dalam gambar berikut ini :



Gambar 4. Grafik Kurva Standar Larutan Fosfat Konsentrasi 1; 2; 3; 4; dan 5 mg/100 mL

Berdasarkan kurva standar fosfat di atas, untuk mengetahui besarnya konsentrasi fosfat yaitu dengan memasukkan nilai absorbansi ke dalam persamaan berikut,

Persamaan
$$x = \frac{y+0,0076}{0,5751}$$

Keterangan

x = konsentrasi fosfat hasil hidrolisis kalsium fosfat

y = nilai absorbansi enzim perlakuan

setelah ditemukan konsentrasi fosfatnya, langkah selanjutnya yaitu

mencari massa fosfat dilanjutkan mencari aktivitas enzim fosfatase

Rumus Mencari Massa fosfat (mf)

Pada Perlakuan

$$gr = \frac{M \times Mr \times P}{1000}$$

Keterangan

gr : Massa fosfat (g)

M : Konsentrasi fosfat (M)

Mr : Berat molekul fosfat = 310

P : Volume pelarut (ml) = 1 ml

Rumus Mencari Aktivitas Enzim

Rumus:
$$AE = \frac{MG \times 1000}{BMg \times MI}$$

Keterangan:

AE : Aktivitas enzim (unit/mL filtrat enzim)

MP : massa fosfat

BMg : berat molekul fosfat= 310

MI : masa inkubasi = 30 menit

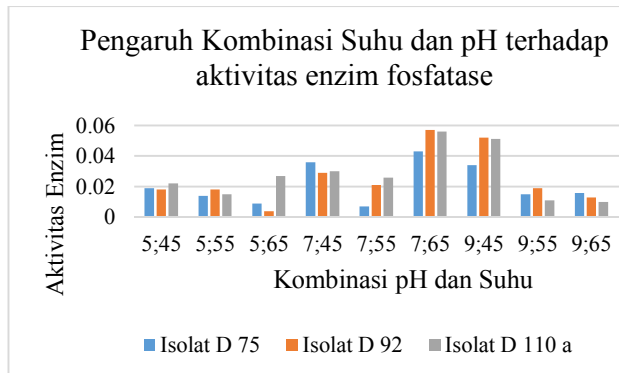
Setelah di masukkan ke dalam rumus, diperoleh aktivitas enzim fosfatase yang disajikan dalam bentuk tabel sebagai berikut :

Tabel 6. Aktivitas Enzim Fosfatase pada Media Psikovkaya Kalsium Fosfat (unit/mL Filtrat Enzim).

Isolat	Suhu(°C) pH	Aktivitas enzim		
		45	55	6 5
D 75	5	0,019	0,014	0,009
	7	0,036	0,007	0,043
	9	0,034	0,015	0,016
D 92	5	0,018	0,018	0,004
	7	0,029	0,021	0,057
	9	0,052	0,019	0,013
D 110 a	5			
		0,022	0,015	0,027
	7	0,030	0,026	0,056
	9	0,051	0,011	0,010

Satuan Aktivitas enzim (unit/mLfiltra enzim)

Dari tabel di atas lalu dibuat grafik untuk melihat pH dan suhu optimum aktivitas enzim fosfatase



Gambar 5. Grafik Pengaruh Suhu dan pH Terhadap Aktivitas Enzim Fosfatase pada Media Pikovskaya Fosfat

Gambar 5 menunjukkan bahwa aktivitas enzim fosfatase optimal pada suhu 65 °C dan pada pH 7, aktivitas enzim menurun ketika suhu diturunkan sampai suhu 45 °C, begitu juga ketika pH diturunkan menjadi 5 dan dinaikkan menjadi 9 maka aktivitas enzim juga menurun.

Peningkatan suhu akan meningkatkan energi kinetik molekul. Peningkatan energi kinetik molekul juga meningkatkan gerakan molekul sehingga frekuensi tumbukan juga meningkat. Kombinasi tumbukan yang lebih sering dan lebih berenergi serta produktif ini akan meningkatkan laju reaksi. Setiap enzim memiliki suhu optimal, yaitu saat laju reaksinya paling cepat. Peningkatan suhu optimal dalam penelitian ini yaitu 65 °C, saat suhu tersebut aktivitas enzim juga naik karena memungkinkan terjadinya tumbukan molekul yang paling banyak dan perubahan reaktan menjadi produk yang paling cepat.

Banyak enzim yang sensitif terhadap perubahan pH dan setiap enzim memiliki pH optimum untuk aktivitasnya. pH optimal pada penelitian ini adalah 7. Perubahan pH

(asam atau basa) dapat menyebabkan berhentinya aktivitas enzim akibat proses denaturasi pada struktur tiga dimensi enzim. Sebagian besar enzim dapat bekerja paling efektif pada kisaran pH lingkungan yang agak sempit.

Di luar pH optimum tersebut kenaikan pH (basa) atau penurunan pH (asam) menyebabkan penurunan aktivitas enzim dengan cepat dan bahkan bisa kehilangan aktivitas katalitiknya. Hal ini terjadi karena struktur tiga dimensi enzim mulai berubah, sehingga substrat tidak dapat berikatan dengan sisi aktif enzim akibatnya proses katalis tidak dapat berlangsung secara sempurna.

Profil aktivitas pH enzim menggambarkan pH pada saat gugus pemberi atau penerima proton yang penting pada sisi katalitik enzim berada dalam tingkat ionisasi yang diinginkan, pH optimum enzim tidak perlu sama dengan pH lingkungan normalnya, dengan pH yang mungkin sedikit berada di atas atau di bawah pH optimum. Aktivitas katalitik enzim di dalam sel bakteri sebagian diatur oleh perubahan pada pH lingkungan.

Sisi aktif enzim Isolat D75, D92, dan D110a dalam lingkungan asam akan berubah, karena sisi aktif enzim yang sebelumnya bermuatan negatif oleh karena lingkungan asam (melepas H^+) menjadi bermuatan positif, akibatnya merubah sisi aktif enzim tersebut sehingga substrat tidak bisa menempel maksimal dan aktivitas enzim menjadi turun. Begitu juga ketika enzim berada dilingkungan basa, sisi aktif enzim yang sebelumnya bermuatan negatif akan berubah menjadi bermuatan positif sehingga substrat tidak dapat menempel dan aktivitas enzim menurun.

KESIMPULAN

Pengaruh suhu dan pH terhadap aktivitas enzim fosfatase bakteri termofilik Sungai Gendol pasca erupsi merapi. Jika suhu dinaikkan sampai 65 °C maka aktivitas enzim menjadi naik, ketika suhu diturunkan sampai suhu 45 °C aktivitas enzim juga turun, aktivitas enzim akan turun pada pH 5 dan pH 9, ketika pH 7 aktivitas enzim menjadi naik. Suhu dan pH yang optimal untuk aktivitas enzim fosfatase yaitu pada suhu 65 °C dan pH 7 untuk isolat D75, D92, dan D110a.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian variasi suhu yang lebih tinggi dari suhu 65 °C untuk menentukan suhu optimal. Perlu dilakukan penelitian tentang identifikasi dan karakterisasi sampai tingkat spesies.

DAFTAR PUSTAKA

- Andrade, C.M.M.C, Nei Pereira Jr., and G. Antranikian. (1999). Extremely Thermophilic Microorganisms and Their Polymerhydrolytic Enzyme. A reviews, departmen of Technology Microbiology, Technical University Hamburg Germany. *Revista de Microbiologia* No. 30:287-298 tahun 1999
- Anna, Rakhmawati , Evy Yulianti, dan Eli Rohaeti. (2014). *Seleksi Bakteri Termofilik Pasca Erupsi Merapi Sebagai Penghasil Enzim Amilase Dan Protease*. Yogyakarta : FMIPA UNY.
- Black, Jacquelyn G. (2008). *Microbiology, Seventh Edition*. United States: John Willey & Son, Inc.
- Evy, Yulianti dan Anna Rakhmawati. (2017). Screening and characterization of phoshate solubilizing bacteria from isolate of thermophilic bacteria. *Conference Proceedings. The 4th International Conference on Research, Implementation and Education of Mathematic and Science (4th ICRIEMS)*. 2017. Yogyakarta: Universitas Negeri Yogyakarta.
- Illmer, P. and F. Schinner. (1992). Solubilization of inorganic phosphate by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biol. Biochem.* 24(4): 389-395.
- Lehninger , Albert. (1982). *Dasar dasar Biokimia*. (Alih bahasa: Dr. Ir. Maggy Thenawidjaja). Jakarta : Penerbit Erlangga.
- Simanungkalit, Didi Ardi Suriadikarta, Rasti Saraswati, Diah Setyorini, dan Wiwik Hartatik. (2006). *Pupuk organik dan pupuk hayati*. Bogor : Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Sumberdaya Lahan Pertanian
- Taha, S.M., and S.A.Z. Mahmoud, A.H. El-Damaty, and A.M. Abd. El-Hafez. (1969). *Activity of phosphate-dissolving bacteria in Egyptian soils*. *Plant Soil* 31(1): 149-160
- Waksman, S.A. and R.L. Starkey. (1981). *The Soil and The Microbe*. John Wiley and Sons, Inc. New York.