

**PENGARUH PENAMBAHAN Cu^{2+} TERHADAP AKTIVITAS
ENZIM UREASE HASIL ISOLASI DARI KAPANG**
Schizosaccharomyces pombe

SKRIPSI

Oleh :
SYAIFUL BAHRI
0210923023-92



JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2009

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



**PENGARUH PENAMBAHAN Cu^{2+} TERHADAP AKTIVITAS
ENZIM UREASE HASIL ISOLASI DARI KAPANG**
Schizosaccharomyces pombe

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Kimia

Oleh :
SYAIFUL BAHRI
0210923023-92



JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2009

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**PENGARUH PENAMBAHAN Cu^{2+} TERHADAP AKTIVITAS
ENZIM UREASE HASIL ISOLASI DARI KAPANG
*Schizosaccharomyces pombe***

Oleh :
SYAIFUL BAHRI
0210923023-92

Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Kimia

Pembimbing I

DR. Chanif Mahdi, MS
NIP : 130 809 059

Pembimbing II

Drs. Sutrisno, MSi
NIP : 131 879 407

Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Dr. Sasangka P, MS
NIP. 131 653 134

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Syaiful Bahri

NIM : 0210923023

Jurusan : Kimia

Penulis skripsi berjudul:

**PENGARUH PENAMBAHAN Cu^{2+} TERHADAP AKTIVITAS
ENZIM UREASE HASIL ISOLASI DARI KAPANG
*Schizosaccharomyces pombe***

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang temaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila di kemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, Agustus 2009

Yang menyatakan,

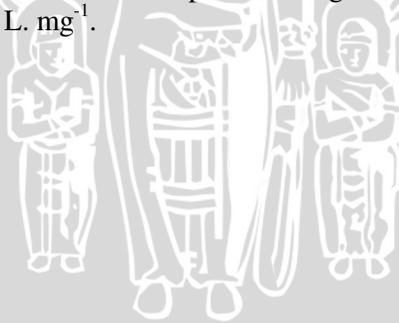
(Syaiful Bahri)

0210923023

**PENGARUH PENAMBAHAN Cu^{2+} TERHADAP AKTIVITAS
ENZIM UREASE HASIL ISOLASI DARI KAPANG
*Schizosaccharomyces pombe***

ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui bagaimana pengaruh penambahan Cu^{2+} terhadap aktivitas enzim urease hasil isolasi dari kapang *Schizosaccharomyces pombe* pada kondisi optimumnya (pH 8, suhu 40°C , dan waktu inkubasi 10 menit). Isolasi enzim urease diawali dengan inokulasi kapang *Schizosaccharomyces pombe* dalam media cair selama 48 jam. Pemisahan enzim dari sel kapang ini dilakukan dengan cara sentrifugasi dingin. Supernatan yang di peroleh merupakan larutan ekstrak kasar dari enzim urease. Uji aktivitas enzim dilakukan dengan metode spektrofotometri dengan pereaksi nessler. Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai V_M didapat sebesar 0,3476 unit dan nilai K_M sebesar 0,1575 mM. Diketahui bahwa dengan penambahan berbagai konsentrasi ion Cu^{2+} memberikan pengaruh berbeda terhadap penurunan aktivitas enzim urease. Hasil kurva yang didapat menunjukkan bahwa jenis penghambatan yang terjadi merupakan jenis penghambatan unkompetitif, dengan konstanta inhibisi (K_i) sebesar $13,75 \text{ L. mg}^{-1}$.



**ADDITION INFLUENCE Cu^{2+} TO UREASE ENZYMATIC
ACTIVITY RESULT OF ISOLATION FROM MOULD
*Schizosaccharomyces pombe***

ABSTRACT

This research is aimed to examine the addition influence of Cu^{2+} to urease enzymatic activity which is resulted from isolation of mould *Schizosaccharomyces pombe* at its optimum condition (hydrogen ion exponent (pH) 8, temperature 40°C , and incubation time 10 minutes). Isolation of the enzyme was started with inoculation of mould *Schizosaccharomyces pombe* at liquid medium during 48 hours. Then separation was taken place by means of cold centrifugation. The supernatant resulted was a crude of urease enzyme. The enzym activity has been analyzed with nessler method. The result of research indicated that the value V_M were 0.3476 units and value K_M 0.1575 mM. The research showed that with addition various concentration of ions Cu^{2+} gave difference influences to degradation of urease enzymatic activity and according to curve resulted that the resistance type occurred is uncompetitif resistance type, with inhibition constant (K_i) 13.75 L. mg^{-1} .

KATA PENGANTAR

Segala puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, taufik dan hidayahNya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan tugas akhir yang berjudul **"Pengaruh Penambahan Cu²⁺ terhadap Aktivitas Enzim Urease Hasil Isolasi dari Kapang *Schizosaccharomyces pombe*"**. Tugas akhir ini disusun sebagai salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Kimia di Fakultas MIPA Universitas Brawijaya.

Dalam penyusunan tugas akhir ini tidak lepas dari bantuan, bimbingan dan perhatian yang telah diberikan oleh berbagai pihak yang telah menyumbangkan tenaga, pikiran dan waktunya. Dalam kesempatan ini penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Dr.Ir. H.Chanif Mahdi, MS dan Drs. Sutrisno, MSi selaku Dosen Pembimbing I dan II yang telah membimbing, memberikan pengarahan dan saran-saran yang telah berguna bagi penulis.
2. Ir. Bambang Ismuyanto, MS selaku penasehat akademik yang telah memberikan bimbingan selama kuliah.
3. Dr. Diah Mardiana, MS; Darjito SSi, MSi; Drs. Suratmo, MSc; Dr. Akhmad Sabarudin selaku dosen penguji yang berkenan untuk menguji, memberi saran dan mengoreksi naskah skripsi ini
4. Dr. Sasangka P, MS selaku Ketua Jurusan Kimia, segenap dosen dan staf akademik Jurusan Kimia atas segala bantuan yang diberikan.
5. Orang tua dan keluarga atas dukungan dan do'anya.
6. Rekan-rekan Kimia dan semua pihak yang telah banyak membantu dalam penulisan tugas akhir ini.

Akhirnya dengan segala keterbatasan, penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun dari semua pihak untuk perbaikan naskah skripsi ini.

Malang, Agustus 2009

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan Penelitian	3
1.5 Manfaat Penelitian	3

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 <i>Schizosaccharomices pombe</i>	4
2.2 Enzim	4
2.2.1 Isolasi enzim	4
2.2.2 Faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim	6
2.2.3 Enzim urease	9
2.2.4 Penghambat enzim urease	10
2.3 Inhibisi	10
2.4 Tembaga (Cu)	18
2.5 Spektrofotometri Sinar Tampak	20
2.6 Hipotesis	20

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	21
3.2 Bahan dan Alat Penelitian	21
3.2.1 Kultur mikroorganisme	21

vii

3.2.2	Bahan kimia	21
3.2.3	Alat penelitian	21
3.3	Metode Penelitian	22
3.4	Cara Kerja	22
3.4.1	Penyiapan media	22
3.4.2	Peremajaan kultur murni	23
3.4.3	Ekstraksi enzim	23
3.4.4	Penentuan aktivitas enzim urease bebas	24
3.4.5	Penentuan aktivitas enzim urease setelah penambahan inhibitor	24
3.4.6	Analisa data	24
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN		
4.1	Produksi dan Isolasi Enzim Urease	25
4.2	Uji Aktivitas Enzim Urease	26
4.3	Pengaruh Penambahan Ion Cu^{2+} terhadap Aktivitas Enzim Urease	28
4.4	Penentuan V_m dan K_M	30
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN		
a.	Kesimpulan	33
b.	Saran	33
DAFTAR PUSTAKA		34
LAMPIRAN		36

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Pengaruh konsentrasi enzim terhadap kecepatan reaksi enzim	6
Gambar 2.2 Pengaruh konsentrasi substrat terhadap kecepatan reaksi enzim	7
Gambar 2.3 Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim	8
Gambar 2.4 Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim	8
Gambar 2.5 Kurva V_0 dari reaksi Michaelis-Menten dengan adanya perbedaan konsentrasi dari inhibitor kompetitif	13
Gambar 2.6 Kurva Lineweaver – Burk dari inhibisi Michaelis Menten secara kompetitif.....	14
Gambar 2.7 Kurva plot Lineweaver – Burk dari suatu enzim Michaelis – Menten sederhana dengan adanya inhibitor unkompetitif.....	15
Gambar 2.7 Kurva Lineweaver – Burk dari suatu enzim Michaelis – Menten sederhana dengan adanya inhibitor campuran.....	17
Gambar 4.1 Kurva hubungan antara Laju dengan Konsentrasi Substrat	28
Gambar 4.2 Kurva pengaruh konsentrasi Cu^{2+} terhadap Aktivitas enzim urease	29
Gambar 4.3 Kurva Lineweaver-Burk dengan Keberadaan Inhibitor nonkompetitif.....	30
Gambar 4.4 Kurva hubungan $1/[S]$ terhadap $1/V$	31
Gambar L.3.1 Kurva panjang Gelombang Maksimum Kompleks Amonia	44
Gambar L.3.2 Kurva Baku Kompleks Amonia.....	46
Gambar L.4.3 Kurva Aktivitas urease pada konsentrasi Cu^{2+} 16 ppm.....	48

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel L.3.1 Absorbansi Larutan ammonia pada berbagai panjang gelombang.....	44
Tabel L.3.2 Pembuatan Kurva Baku Amonia.....	45
Tabel L.3.3 Data Perhitungan Regresi Linier dan Koefisien Kurva Baku Amonia	45
Tabel L.4.1 Data aktivitas urease dari berbagai konsentrasi Substrat.....	47
Tabel L.4.2 Data aktivitas urease dari berbagai konsentrasi Cu^{2+}	48
Tabel L.4.3 Data aktivitas urease pada konsentrasi Cu^{2+} 16 ppm .	48
Tabel L.5.1 Data perlakuan konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim	49
Tabel L.5.2 Data perhitungan Regresi Linier dan Koefisien grafik K_M dan V_{maks}	49
Tabel L.6.1 Data Penentuan F_{hitung}	52
Tabel L.6.2 Uji BNT 5% pada variasi $[\text{Cu}^{2+}]$	54
Tabel L.7.1 Penentuan Konstanta Inhibisi.....	55

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Preparasi Larutan	36
Lampiran 2 Diagram Kerja.....	39
Lampiran 3 Data Tabel Pengukuran λ Amonia dan Kurva Baku Amonia	44
Lampiran 4 Data Pengukuran Aktivitas Urease	47
Lampiran 5 Penentuan Nilai K_M dan V_{maks}	49
Lampiran 6 Data Uji pengaruh konsentrasi Cu^{2+} terhadap aktivitas urease.....	52
Lampiran 7 Konstanta Inhibisi	55



UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Enzim merupakan protein yang diproduksi oleh sel hidup dan digunakan oleh sel-sel tersebut untuk mengkatalisis reaksi kimia yang spesifik. Enzim merupakan produk yang mempunyai nilai ekonomi tinggi karena sangat dibutuhkan untuk menunjang berbagai proses industri. Salah satu cara untuk memproduksi enzim yang sering dilakukan pada saat ini adalah dengan membiakkan mikroba penghasil enzim yang dikehendaki pada media tertentu kemudian diekstraksi (Wirakartakusumah, 1987).

Enzim dapat diisolasi dari tanaman ataupun jaringan hewan, namun produksi enzim dengan cara ini memiliki beberapa kekurangan diantaranya dalam hal waktu dan biaya. Banyak keuntungan yang diperoleh apabila menggunakan enzim dari mikroba bila dibandingkan dengan menggunakan tanaman maupun hewan antara lain biaya produksi relatif lebih ringan, dapat diproduksi dalam waktu singkat sesuai permintaan dan mudah dikontrol. Kecepatan produksi ini dapat ditingkatkan dengan seleksi galur, induksi mutan dan perbaikan kondisi kultur pertumbuhan. Sehingga alternatif produksi enzim dari mikroba dirasakan sesuai untuk menggantikannya (Smith, 1990).

Urease merupakan enzim yang dapat menghidrolisis urea menjadi amonia dan karbondioksida. Urease pertama kali diisolasi dari biji kacang-kacangan seperti kacang merah dan kacang polong. Selain dari biji-bijian enzim urease dapat diisolasi dari mikroorganisme seperti kapang. Kapang yang dapat menghasilkan enzim urease ini adalah kapang dari golongan ascomycetes dan basidiomycetes. Aktivitas urease dari basidiomycetes lebih tinggi dibandingkan dengan ascomycetes, seperti kapang *Schizosaccharomyces pombe* (Booth and Vishniac, 1987).

Analisis urea merupakan suatu hal yang sangat penting dibidang kimia pertanian karena urea digunakan dalam pupuk, dan juga untuk penentuan kualitas air. Urease juga dapat digunakan untuk menghilangkan urea dari minuman berfermentasi seperti sake. Bentuk amobil dari urease juga dapat dikembangkan untuk membuat

” simple kit ” yang digunakan untuk mendeteksi kadar urea dalam sampel susu (Punit, *et al.*, 2001).

Dalam mengkatalisis suatu reaksi, enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu pH, suhu, waktu reaksi enzimatik, konsentrasi substrat (Lehninger, 1990). Selain itu enzim juga mempunyai karakter yang bersifat spesifik yaitu konstanta Michaelis-Menten (K_M) yang menyatakan konsentrasi substrat pada saat enzim mencapai setengah kecepatan maksimumnya dan kecepatan maksimum (V_{maks}) yang menyatakan kecepatan maksimum yang dicapai pada saat konsentrasi substrat tinggi (Winarno, 1986). Enzim dapat bekerja dengan baik pada kondisi-kondisi tertentu seperti pH optimum, suhu optimum, dan waktu inkubasi optimum. Oleh karena itu dalam penelitian ini dilakukan uji aktivitas enzim urease pada pH, suhu, dan waktu inkubasi optimum.

Urea adalah bahan utama dari pupuk N yang digunakan untuk menyuburkan tanaman padi khususnya di daerah tropis Asia. Namun demikian, hal tersebut tidak dapat digunakan secara efisien sehubungan dengan pertimbangan hilangnya nitrogen (N) dari lahan tanaman padi melalui penguapan gas amonia (NH_3). Salah satu cara untuk mengurangi hilangnya gas amonia (NH_3) yaitu dengan menggunakan penghambat enzim urease (*urease inhibitor*) yang efektif untuk menunda proses hidrolisis dari urea, sehingga mengurangi potensi hilangnya gas amonia (NH_3). Penghambatan ini bertujuan untuk menyeimbangkan laju reaksi hidrolisis urea dengan daya serap tanaman sehingga dapat mengurangi penguapan amonia dan mempertahankan kesuburan tanah.

Aktivitas enzim urease dapat dihambat oleh kofaktor logam seperti Ag(I), Hg(II), Cu(I), Cu(II), Fe(II), Zn(II), Co(II), dan Ni(II) (Shaw and Raval, 1961). Dari beberapa logam tersebut Cu^{2+} merupakan logam yang mempunyai hambatan yang relatif tinggi terhadap aktivitas urease. Pengaruh ion Cu^{2+} dalam menghambat atau menginhibisi dapat dinyatakan sebagai Konstanta Inhibisi (K_i). Nilai K_i dapat diperoleh dengan cara membandingkan kurva Lineweaver – Burk aktivitas enzim urease tanpa dan dengan penambahan inhibitor.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, permasalahan yang diajukan adalah :

1. Bagaimana pengaruh konsentrasi Cu^{2+} terhadap aktivitas urease hasil isolasi dari kapang *Schizosaccharomyces pombe*.
2. Berapakah nilai K_M , V_{maks} , dan Konstanta Inhibisinya (K_i)

1.3 Batasan Masalah

Enzim yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak kasar urease hasil isolasi dari kapang *Schizosaccharomyces pombe*.

1.4 Tujuan Penelitian

1. Mempelajari bagaimana pengaruh konsentrasi Cu^{2+} terhadap aktivitas urease hasil isolasi dari kapang *Schizosaccharomyces pombe*.
2. Menentukan nilai K_M , V_{maks} dan K_i

1.5 Manfaat Penelitian

Melalui penelitian ini dapat diketahui sejauh mana efektifitas Cu^{2+} dapat menjadi inhibitor urease dalam kaitannya dengan peran enzim urease dalam proses hidrolisis urea sebagai penyubur lahan pertanian.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Schizosaccharomyces pombe*

Schizosaccharomyces pombe merupakan suatu sel eukariotik yang uniseluler, selnya berbentuk batang/ tangkai. Sel ini mempertahankan bentuknya dengan tumbuh secara eksklusif melalui ujung selnya yaitu dengan melakukan pembelahan tepat pada tengah yang akhirnya menghasilkan dua sel dengan ukuran yang sama.

Klasifikasi dari jamur *schizosaccharomyces pombe* adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Fungi
Phylum	: Ascomycota
Class	: <i>Schizosaccharomycetes</i>
Ordo	: <i>Schizosaccharomycetales</i>
Family	: <i>Schizosaccharomycetaceae</i>
Genus	: <i>Schizosaccharomyces</i>
Spesies	: <i>S. pombe</i>

Sesuai dengan aturan binomial jamur ini memiliki nama *Schizosaccharomyces pombe*

Schizosaccharomyces pombe mudah dibudidayakan dan dimanipulasi. Inti gen dari jamur ini sudah memiliki sequence. Jika dibandingkan dengan *Saccharomyces cerevisiae*, kapang ini memiliki model sistem yang hampir sama (Mobley and Hausinger, 1989).

2.2 Enzim

2.2.1 Isolasi enzim

Enzim adalah suatu katalisator biologis yang dihasilkan oleh sel-sel hidup dan dapat membantu mempercepat bermacam-macam reaksi kimia (Winarno, 1986).

Enzim adalah suatu protein yang harus dipisahkan dengan komponen protein lain. Berdasarkan lokasi enzim di dalam sel, maka dikenal istilah enzim ekstra selular (di luar sel) dan enzim intraseluler (di dalam sel). Prosedur isolasi untuk enzim ekstraseluler

berbeda dengan enzim intraseluler. Isolasi enzim ekstra seluler lebih mudah dibanding enzim intraseluler, karena tanpa pemecahan sel dan enzim yang diperoleh relatif lebih mudah terpisah dari pengotornya (Martoharsono, 1987).

Untuk melakukan proses penghancuran dinding sel dan membran pada proses ekstraksi enzim, metode yang digunakan tergantung pada tipe sel itu sendiri. Sel tanaman umumnya lebih sulit dihancurkan dari sel hewan, karena adanya polisakarida di sekitarnya. Walaupun demikian tidak ada patokan yang tetap tentang jenis teknik penghancuran tersebut, mengingat enzim dapat saja tidak aktif selama proses berlangsung (Martoharsono, 1987).

Ada beberapa metode penghancuran sel yaitu (Martoharsono, 1987):

A. Cara fisika

1. dengan menggunakan alat pemancar gelombang *ultrasonic* yang disebut ultrasenikator. Hal ini ditandai dengan berubahnya cairan keruh dari sel menjadi endapan dan cairan jernih.
2. dengan penggerusan, penggilingan memakai pasir kwarsa bersih dan steril
3. dengan blender
4. dengan homogenisator
5. pembekuan, hal ini dikarenakan adanya sifat anomaly air.

B. Cara kimia

Cara kimia ini adalah suatu cara yang didasarkan pada sifat dari dinding sel. cara kimia ini dapat dilakukan melalui tekanan osmotik, penambahan basa penggunaan detergen, dengan solvent organic, osmotik shock dan lisis secara enzimatik.

Setelah melalui penghancuran maka untuk mendapatkan ekstrak kasar dari enzim harus dilakukan proses sentrifugasi guna memisahkan enzim dari senyawa yang tidak larut. Agar pada proses sentrifugasi enzim berada pada lapisan air (supernatan) maka sebelum dilakukan proses sentrifugasi ekstra kasar enzim dihomogenasi dengan larutan penyangga (larutan buffer) (Cooper, 1977).

Cara lain yang dapat dilakukan untuk mendapatkan enzim pada membran sel yang memiliki sifat lipoprotein adalah melalui

pencucian dengan detergen seperti triton X-100 dan SDS (Sudarmadji, 1996).

2.2.2 Faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim

Aktivitas suatu enzim umumnya dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu (Martin, *et al.*, 1987):

1. Konsentrasi enzim

Kecepatan reaksi enzimatik sebanding dengan konsentrasi enzim yang dapat dinyatakan dengan persamaan :

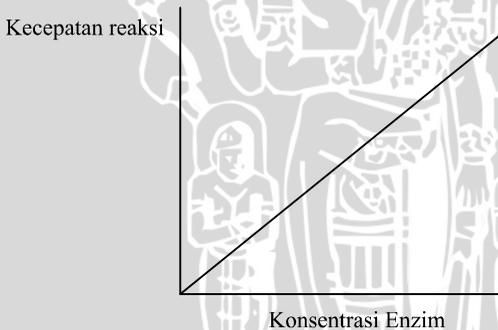
$$V = K[E][S]$$

Dimana : K = konstanta kecepatan reaksi

E = konsentrasi enzim

S = konsentrasi substrat

Pada batas-batas konsentrasi tertentu, hubungan antara konsentrasi enzim dan kecepatan reaksi dapat digambarkan sebagai berikut (Martin, *et al.*, 1987)

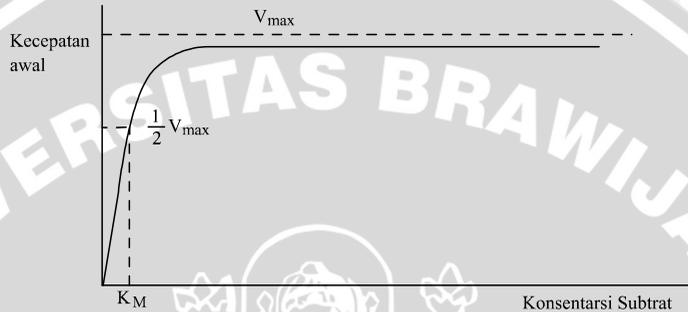


Gambar 2.1 Pengaruh Konsentrasi Enzim terhadap Kecepatan Reaksi Enzim

2. Konsentrasi substrat

Semakin tinggi konsentrasi substrat maka kecepatan reaksi enzimatik meningkat sampai mencapai kecepatan tetap yaitu enzim telah jenuh dengan substrat.

Hubungan antara pengaruh konsentrasi substrat dengan kecepatan reaksi enzim dapat digambarkan sebagai berikut (Martin, *et al.*, 1987):



Gambar 2.2 Pengaruh Konsentrasi Substrat Terhadap Kecepatan Reaksi Enzim

Bentuk kurva kejenuhan di atas dapat dinyatakan secara matematika dengan persamaan Michaelis – Menten :

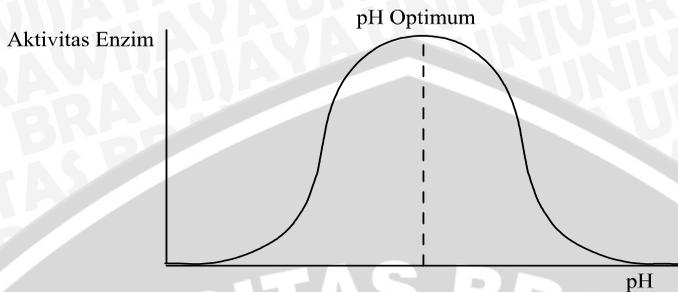
$$V_0 = \frac{V_{maks} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

dimana : V_0 = kecepatan awal pada konsentrasi substrat
 V_{maks} = kecepatan maksimum
 K_m = tetapan Michaelis-Menten

3. Pengaruh pH

Semua reaksi enzimatik dipengaruhi oleh pH medium tempat reaksi terjadi, oleh karena itu pada setiap percobaan menggunakan enzim diperlukan buffer untuk mengontrol pH reaksi. Dimana umumnya enzim aktif pada pH netral yaitu pH cairan hidup, akan tetapi kisaran keaktifan enzim dapat mencapai pH 5-9.

Hubungan antara pengaruh pH terhadap aktivitas enzim dapat digambarkan sebagai berikut (Martin, *et al.*, 1987) :

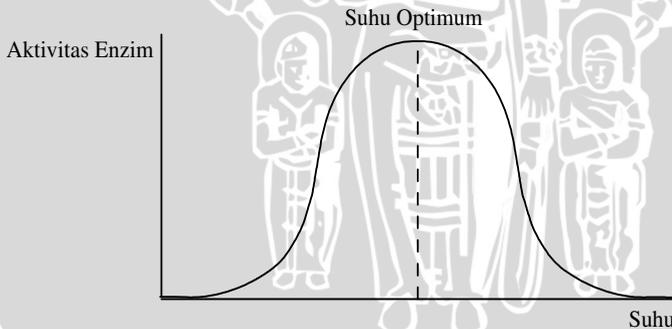


Gambar 2.3 Pengaruh pH terhadap Aktivitas Enzim

4. Pengaruh suhu

Pengaruh suhu terhadap enzim memiliki masalah yang sangat kompleks. Pada suhu tinggi dapat mempercepat pemecahan atau kerusakan enzim, tetapi semakin tinggi suhu semakin aktif enzim tersebut. Bila suhu makin naik, laju kerusakan enzim akan melampaui reaksi katalitis enzim. Pada suhu rendah, laju inaktivasi enzim sangat lambat sehingga boleh diabaikan. Sebaliknya pada suhu tinggi laju inaktivasi enzim makin cepat sehingga reaksi enzimatik praktis berhenti sama sekali.

Hubungan antara suhu dengan kecepatan reaksi enzim dapat dinyatakan sebagai berikut (Martin, *et al.*, 1987).



Gambar 2.4 pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim

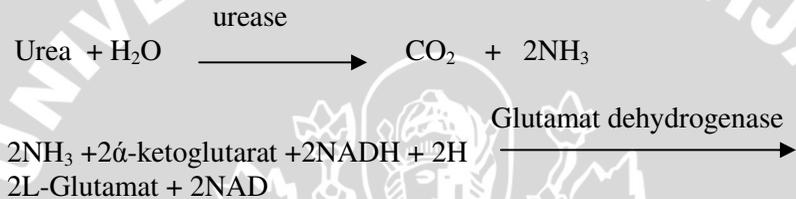
5. Waktu inkubasi

Aktivitas enzim juga dipengaruhi oleh waktu inkubasi. Waktu inkubasi adalah waktu yang diperlukan enzim untuk berikatan

dengan substrat. Makin lama waktu inkubasi maka makin banyak enzim yang berikatan dengan substrat sehingga semakin banyak pula produk yang terbentuk tetapi bila enzim sudah jenuh dengan substrat maka waktu inkubasi sudah tidak mempengaruhi lagi.

2.2.3 Enzim Urease

Urease berfungsi untuk menghidrolisis urea menjadi amonia dan karbondioksida, dimana hidrolisis terjadi secara spontan menghasilkan karbondioksida dan dua molekul amonia. Adapun kerja dari enzim ini adalah sebagai berikut (Andrews, 1984) :



Urease ditemukan pada tanaman, alga, invertebrata, filamen jamur, dan bakteri yang mencakup archaeobacteria. Urease diproduksi oleh lebih dari seribu bakteri. Dahulu enzim ini digunakan sebagai dasar klasifikasi akan tetapi sekarang hubungan antara enzim ini dengan patogenitasnya telah banyak diketahui.

Urease memiliki masa molukul sebesar 480 kDa dan strukturnya terdiri dari 8 protomer. Bentuk amobilisasi dari enzim urease ini dapat digunakan sebagai membran pada alat biosensor urea, dimana enzim urease ini akan bereaksi dengan urea membentuk NH_4^+ atau NH_3 pada pH yang berbeda. Reaksinya dapat ditulis sebagai berikut (Chaplin, 2004):



2.2.4 Penghambat enzim urease

Enzim urease (*urea amidohydrolase*) merupakan enzim yang tersebar diberbagai jaringan tanah dan telah banyak diisolasi dari berbagai macam mikroba dan berbagai macam jenis tumbuhan. Dalam jaringan tanah, urease berperan sebagai katalis hidrolisis urea menjadi amoniak dan karbon dioksida. Amoniak yang terbentuk kemudian dihidrolisis menjadi garam-garam amoniak.



NH_4^+ kemudian dirubah menjadi NO_3^- oleh bakteri aerobik melalui proses nitrifikasi di dalam tanah.



Rangkaian reaksi ini merupakan reaksi yang sangat penting dalam menghasilkan nitrogen anorganik yang berguna bagi pertumbuhan tanaman. Walaupun demikian, urease yang berperan dalam proses hidrolisis urea dapat menyebabkan banyak hilangnya amoniak melalui proses penguapan, khususnya ketika pupuk urea digunakan pada tanah persawahan (Shaw dan Raval, 1961).

Aktivitas enzim urease dapat dihambat oleh berbagai jenis logam yang tersusun menurut penurunan toksisitasnya sebagai berikut : Cu(II), Zn(II), Ni(II), Co(II), Fe(II), dan Mn(II). Dari berbagai jenis logam tersebut Cu(II) memiliki hambatan yang paling tinggi terhadap aktivitas urease (Shaw dan Raval, 1961).

2.3 Inhibisi

Banyak bahan yang dapat mempengaruhi aktivitas dari suatu enzim dengan mereaksikannya dalam suatu reaksi yang mempengaruhi ikatan substrat dengan enzim. Bahan-bahan yang dapat mereduksi aktivitas suatu enzim dengan cara ini dikenal sebagai inhibitor.

Ada berbagai mekanisme dimana inhibitor enzim dapat bekerja. Dalam bagian ini, akan dibicarakan beberapa mekanisme

serupa yang paling sederhana dan efeknya pada aktivitas kinetik enzim yang mengikuti model Michaelis Menten (Lehninger, 1978).

- **Inhibisi Kompetitif**

Suatu senyawa yang berkompetisi secara langsung dengan suatu substrat normal pada daerah (site) ikatan enzim dikenal dengan inhibitor kompetitif. Jenis inhibitor seperti ini biasanya menyerupai substrat dimana secara spesifik mengikat daerah aktif tetapi bila berbeda darinya menjadi tidak reaktif. Untuk itu, methotrexate merupakan suatu inhibitor kompetitif dari dihidrofolat reduktase. Sama seperti suksinat dehidrogenase, suatu enzim siklus asam sitrat, yang berfungsi untuk mengubah suksinat menjadi fumarat, secara kompetitif di inhibisi oleh malonat, dimana secara strukturnya menyerupai suksinat tetapi tidak dapat terdehidrogenasi.

Model umum untuk inhibisi kompetitif diberikan pada skema reaksi di bawah ini :



Diasumsikan bahwa I, inhibitor akan berikatan secara reversibel kepada enzim dan dicapai kesetimbangan dengan cepat sehingga :

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad (1)$$

dan EI, kompleks enzim inhibitor, secara katalitik tidak aktif. *Inhibitor kompetitif bekerja dengan mereduksi konsentrasi enzim bebas yang tersedia untuk mengikat substrat.*

Untuk memperoleh nilai V_0 yaitu dengan menurunkan persamaan Michaelis Menten, yang dihitung dengan adanya EI.

$$[E]_T = [E] + [EI] + [ES] \quad (2)$$

Konsentrasi enzim dapat dinyatakan sebagai [E] dengan mengatur kembali persamaan di atas pada kondisi kesetimbangan (steady-state).

$$[E] = \frac{K_m[ES]}{[S]} \quad (3)$$

Kompleks enzim . inhibitor diperoleh dengan mengatur kembali persamaan (1) dan mensubstitusi persamaan (3) ke dalamnya.

$$[EI] = \frac{[E][I]}{K_i} = \frac{K_m[ES][I]}{[S]K_i} \quad (4)$$

Dengan mensubstitusi kedua hasil sebelumnya dalam persamaan (2) diperoleh :

$$[E]_T = [ES] \left\{ \frac{K_M}{[S]} \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) + 1 \right\} \quad (5)$$

dimana dapat diperoleh [ES] dengan mengatur kembali persamaan tersebut

$$[ES] = \frac{[E]_T[S]}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) + [S]}$$

maka, persamaan untuk kecepatan awal dinyatakan dengan :

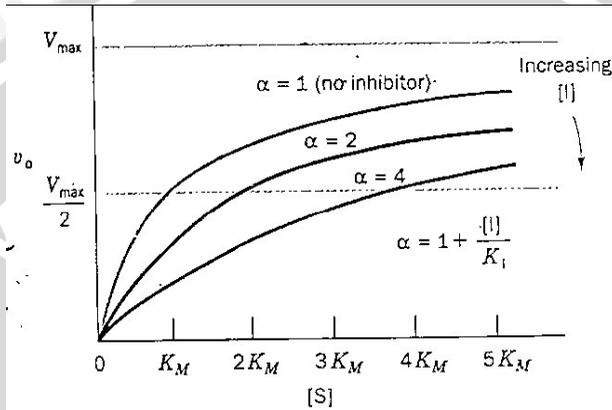
$$V_o = k_2[ES] = \frac{k_2[E]_T[S]}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) + [S]} \quad (6)$$

Lalu mengingat bahwa :

$$\alpha = \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) \quad (7)$$

dan $V_{max} = k_2[E]T$, maka persamaan (6) menjadi :

$$V_o = \frac{V_{max}[S]}{\alpha K_M + [S]} \quad (8)$$



Gambar 2.5 Suatu plot kecepatan V_o dari reaksi Michaelis Menten sederhana versus konsentrasi substrat $[S]$ dengan adanya perbedaan konsentrasi dari inhibitor kompetitif.

Persamaan ini adalah persamaan Michaelis-Menten dengan K_M dimodulasikan dengan α , suatu fungsi konsentrasi inhibitor (yang menurut persamaan [7], harus bernilai ≥ 1). Nilai dari $[S]$ pada $V_o = V_{max}/2$ adalah αK_M .

Gambar 2.5 menunjukkan plot hiperbola persamaan [8] pada variasi nilai α . Perhatikan bahwa pada $[S] = \infty$, $V_o = V_{max}$ untuk setiap nilai α . Semakin besar nilai α , semakin besar pula $[S]$ yang dibutuhkan untuk mencapai nilai V_{max} . Untuk itu, inhibitor tidak mempengaruhi nilai aktivitas dari enzim. Hal ini lebih kepada keberadaan I yang mengakibatkan $[S]$ menjadi lebih sedikit daripada kenyataannya, atau secara tidak langsung membuat K_M menjadi lebih besar daripada kenyataannya. Sebaliknya peningkatan $[S]$ mengubah kesetimbangan ikatan substrat terhadap ES. Dengan demikian, terdapat kompetisi sebenarnya antara I dan S untuk daerah (site) ikatan enzim substrat, ikatannya adalah mutually exclusive.

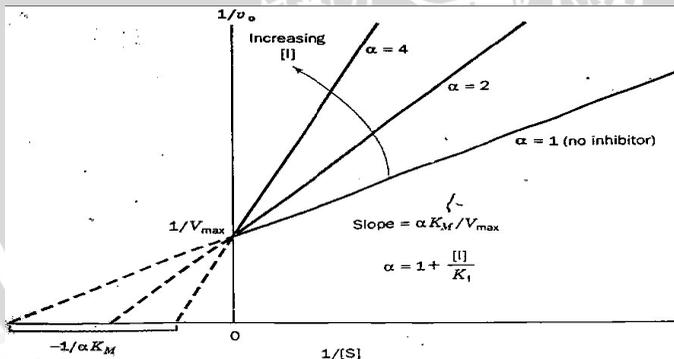
Dengan merujuk pada persamaan [8] dalam bentuk resiprok ganda diperoleh persamaan :

$$\frac{1}{V_o} = \left(\frac{\alpha K_M}{V_{max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (9)$$

Suatu plot dari persamaan ini linier dan memiliki slope $\alpha K_M / V_{max}$, intersep dari $1/[S]$ adalah $-1/\alpha K_M$, dan intersep dari $1/V_o$ adalah $1/V_{max}$ (Gambar 2.6). Plot resiprok ganda untuk inhibitor kompetitif pada variasi konsentrasi I berpotongan pada $1/V_{max}$ dalam aksis $1/V_o$; ini diagnose untuk inhibisi kompetitif untuk membandingkan dengan tipe-tipe inhibisi lain.

Dengan menentukan nilai-nilai α pada berbagai konsentrasi inhibitor yang berbeda-beda, nilai K_i dapat dibentuk dari persamaan [8]. Dengan cara ini, inhibitor-inhibitor kompetitif dapat digunakan untuk menyelidiki struktur alamiah dari suatu daerah (site) aktif. Sebagai contoh untuk menunjukkan pentingnya berbagai segmen dari suatu molekul ATP untuk berikatan dengan daerah (site) aktif dari enzim ATP yang diperlukan, salah satu dapat menentukan K_i , seperti, untuk ADP, AM (adenosan monofosfat), ribosa, trifosfat dan lain-lain. Oleh karena banyak komponen ATP ini secara katalitik tidak aktif, penelitian tentang inhibisi adalah bagian yang paling sesuai untuk memonitor ikatannya terhadap enzim.

Apabila inhibitor mengikat enzim secara irreversibel, inhibitor tersebut digolongkan sebagai suatu **inaktivator**.



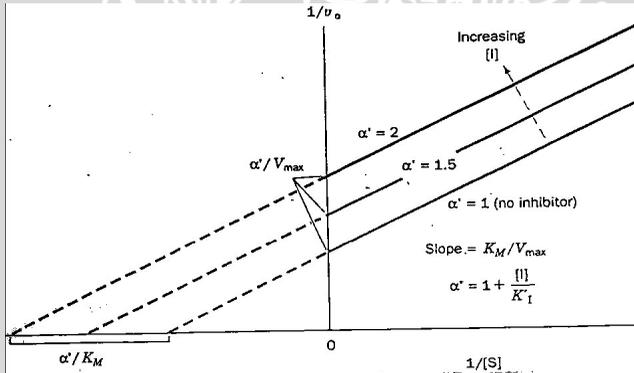
Gambar 2.6 Suatu plot Lineweaver – Burk dari inhibisi Michaelis Menten secara kompetitif. Perhatikan semua garis berpotongan pada $1/V_o$ aksis pada $1/V_{max}$

- **Inhibisi Unkompetitif**

Dalam inhibisi unkompetitif, inhibitor mengikat secara langsung ke kompleks enzim-substrat tetapi tidak ke enzim bebas. Tingkat peningkatan inhibitor, yang mana memiliki konstanta disosiasi

$$K_I' = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \quad (10)$$

diasumsikan pada tingkat kesetimbangan. Ikatan inhibitor non- kompetitif, yang mana tidak perlu menyerupai substrat, bayangkan mengakibatkan distorsi struktural dari daerah aktif, sehingga mengakibatkan enzim secara katalitik tidak aktif. (Apabila inhibitor berikatan dengan enzim sendiri, inhibitor tersebut juga tidak aktif tanpa mempengaruhi affinitasnya terhadap substrat).



Gambar 2.7 Suatu plot Lineweaver – Burk dari suatu enzim Michaelis – Menten sederhana dengan adanya inhibitor unkompetitif. Perhatikan bahwa semua garis memiliki slope identik K_M / V_{max} .

Persamaan Michaelis . Menten untuk inhibisi non-kompetitif yang diturunkan, adalah :

$$V_o = \frac{V_{\max}[S]}{\alpha K_M + \alpha' [S]} \quad (11)$$

Dimana,

$$\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K_I} \quad (12)$$

Persamaan ini menunjukkan bahwa pada nilai [S] yang tinggi, V_o mendekati V_{\max}/α' secara asimptomatik sehingga berbeda dengan inhibitor kompetitif, efek dari inhibisi yang tidak kompetitif pada V_{\max} adalah tidak dapat balik oleh peningkatan konsentrasi substrat. Namun, pada konsentrasi substrat yang rendah, dalam hal ini, bila $[S] \ll K_M$, maka pengaruh inhibisi yang tidak kompetitif dapat diabaikan, demikian juga sifat yang berlawanan dari inhibisi kompetitif.

Bila dibuat dalam persamaan resiprok ganda, persamaan [11] menjadi :

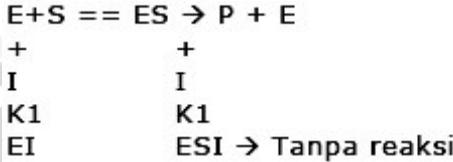
$$\frac{1}{V_o} = \left(\frac{K_M}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{\max}} \quad (13)$$

Plot Lineweaver-Burk untuk inhibisi (hambatan) yang tidak kompetitif adalah linier dengan kemiringan atau slope K_M/V_{\max} seperti dalam reaksi yang tidak terhambat, dan dengan yang memotong $1/V_o$ dan $1/[S]$ berupa α'/V_{\max} dan $-\alpha'/K_M$. Serangkaian plot Lineweaver-Burk pada berbagai konsentrasi inhibitor yang tidak kompetitif terdiri dari serangkaian garis parallel (gbr.2.7). Ini adalah ciri-ciri dari inhibisi yang tidak kompetitif.

Inhibisi yang tidak kompetitif menyatakan bahwa inhibitor ini akan mempengaruhi fungsi enzim tetapi tidak terhadap ikatan dengan substrat. Untuk enzim dengan substrat tunggal, sangat sulit untuk mengemukakan bagaimana hal ini terjadi dengan pengecualian terhadap inhibitor kecil seperti proton atau ion logam. Sebagaimana diketahui bahwa, inhibisi yang tidak kompetitif sangat penting bagi enzim dengan multisubstrat.

- **Inhibisi Campuran**

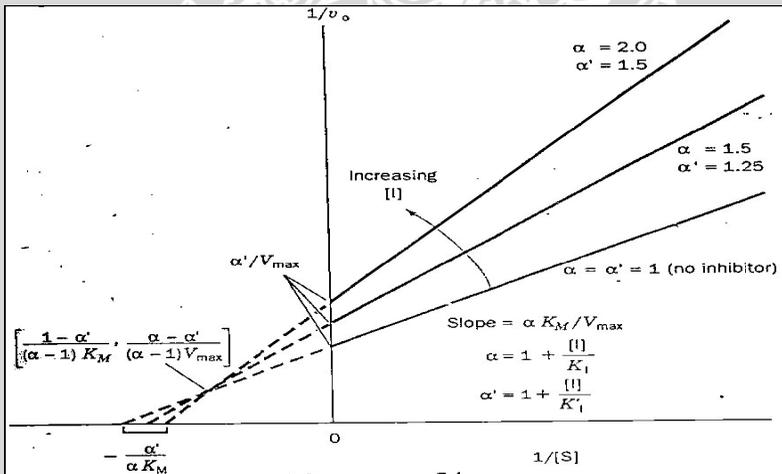
Jika enzim dan senyawa substrat-enzim mengikat inhibitor, maka reaksi berikut ini akan dihasilkan :



Kedua langkah reaksi inhibisi ini dianggap terjadi pada kesetimbangan tetapi dengan konstanta disosiasi yang berbeda :

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad \text{dan} \quad K'_I = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \quad (14)$$

Fenomena ini dikenal sebagai inhibisi campuran (mixed inhibition) atau inhibisi yang tidak kompetitif (non competitive inhibition). Kemungkinan, inhibisi campuran berikatan dengan bagian (site) enzim yang ikut serta baik dalam pengikatan substrat dan katalisator.



Gambar 2.8 Suatu plot Lineweaver – Burk dari suatu enzim Michaelis – Menten sederhana dengan adanya inhibitor campuran

Persamaan Michaelis . Menten untuk inhibisi campuran adalah :

$$V_o = \frac{V_{\max}[S]}{\alpha K_M + a'[S]} \quad (15)$$

Dimana α dan α' telah didefinisikan dalam pers [7] dan [12]. Juga dapat dilihat dari persamaan [15] bahwa nama dari inhibisi campuran muncul dari fakta bahwa denominator merupakan faktor α yang dikalikan K_M seperti dalam inhibisi kompetitif, (persamaan [8]) dan faktor α . Dikali dengan $[S]$ seperti dalam inhibisi tidak kompetitif (persamaan [11]). Inhibisi campuran ini akan efektif, baik dalam konsentrasi substrat yang tinggi dan rendah.

Persamaan Lineweaver . Burk untuk penghambatan campuran adalah:

$$\frac{I}{V_o} = \left(\frac{\alpha K_M}{V_{\max}} \right) \frac{I}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{\max}} \quad (16)$$

Plot dari persamaan ini terdiri dari garis yang memiliki kemiringan (slope) $\alpha K^M/V_m$ dengan perpotongan terhadap $1/V_o$, adalah α/V_{\max} dan perpotongan terhadap $1/[S]$ adalah $-\alpha/\alpha K_m$. Penurunan aljabar dari persamaan [16] untuk nilai yang berbeda dari $[I]$ menunjukkan bahwa persamaan ini menjelaskan kumpulan garis yang memotong sisi kiri dari sumbu $1/V_o$ (Gambar 2.8); untuk kasus khusus dimana $K_1 = K_1$. ($\alpha=\alpha$), perpotongannya adalah pada aksis $1/[S]$. Persamaan K_M dan V_{\max} adalah nilai yang terlihat dari K_M dan V_{\max} yang secara actual diamati dengan adanya inhibitor untuk persamaan Michaelis . Menten yang menjelaskan enzim yang dihambat.

2.4 Tembaga (Cu)

Tembaga adalah unsur kimia dalam tabel periodik yang mempunyai lambang Cu yang mempunyai nomer atom 29. Tembaga merupakan logam yang dapat ditempa yang mempunyai konduktivitas yang sangat baik, dan banyak digunakan sebagai bahan bangunan, konduktor listrik, dan juga sebagai komponen beberapa campuran logam. Tembaga merupakan logam yang berwarna kemerahan yang mempunyai konduktivitas elektrik dan

konduktivitas termal yang tinggi yang tidak larut dalam air (H_2O), dan isopropanol, atau isopropil alkohol.

Kerak bumi mengandung Cu sekitar 55 ppm. Dalam tanah, Cu berbentuk senyawa dengan S, O, CO_3 dan SiO_4 misalnya kalkosit (Cu_2S), kovelit (CuS), kalkopirit ($CuFeS_2$), borinit (Cu_5FeS_4), luvigit (Cu_3AsS_4), tetrahidrit [$(Cu,Fe)_{12}SO_4S_3$], kufirit (Cu_2O), sinorit (CuO), malasit [$Cu_2(OH)_2CO_3$], adirit [$(Cu_3(OH)_2(CO_3))$], brosanit [$Cu_4(OH)_6SO_4$] (Afandhi dan Nasih, 2002)..

Ketersediaan Cu paling optimal adalah pada pH 5,5 sehingga pada tanah asam, sulfat asam, serta tanah yang memiliki pH tinggi misalnya Grumusol dan tanah garaman ketersediaan Cu rendah. Demikian juga, proses pengapuran yang berlebihan (over liming) menyebabkan turunnya ketersediaan Cu dalam tanah. Ketersediaan dan perubahan valensi Cu dipengaruhi juga oleh cara pengelolaan tanah. Pada tanah yang disawahkan, hara Cu direduksi menjadi bervalensi rendah, misalnya Cu_2O , CuS , dan Cu_2S . Penggenangan tanah sering menyebabkan terjadinya penurunan ketersediaan Cu dan hara mikro pada umumnya.

Dalam tanah gambut, Cu dijumpai dalam bentuk ion divalent. Selain itu, Cu juga terdapat dalam bentuk senyawa kompleks dengan organik sebagai kation yang dapat ditukarkan atau dalam larutan tanah. Konsentrasi Cu dalam tanah gambut relatif sangat rendah hanya 1,6 – 16 ppm, sehingga tanaman pada tanah gambut umumnya kekurangan Cu (Afandhi dan Nasih, 2002).

Tembaga (Cu) diserap dalam bentuk ion Cu^{2+} dan mungkin dapat diserap dalam bentuk senyawa kompleks organik, misalnya Cu-EDTA (Cu-ethilen diamine tetra acetate acid) dan Cu-DTPA (Cu diethilen triamine penta acetate acid). Dalam getah tanaman baik dalam xylem maupun floem hampir semua Cu membentuk kompleks senyawa dengan asam amino. Cu dalam akar tanaman dan dalam xylem > 99% dalam bentuk kompleks. Tanaman yang terkenal respon terhadap Cu adalah kentang dan jagung (Afandhi dan Nasih, 2002).

Fungsi dan peranan Cu bagi tumbuhan antara lain : mengaktifkan enzim sitokrom-oksidadase, askorbit-oksidadase, asam butirrat-fenolase dan laktase. Berperan dalam metabolisme protein dan karbohidrat, berperan terhadap perkembangan tanaman generatif,

berperan terhadap fiksasi N secara simbiotis dan penyusunan lignin. Adapun gejala defisiensi / kekurangan Cu antara lain : pembungaan dan pembuahan terganggu, warna daun muda kuning dan kerdil, daun-daun lemah, layu dan pucuk mengering serta batang dan tangkai daun lemah (Afandhi dan Nasih, 2002)

2.5 Spektrofotometri Sinar Tampak

Spektrofotometri sinar tampak dapat digunakan untuk analisa kuantitatif dan kualitatif dengan kisaran panjang gelombang antara 400-750 nm. Dasar analisis kuantitatif secara spektrofotometri memenuhi Hukum Lambert Beer pada persamaan berikut :

$$A = a b c$$

A = Absorbansi

a = absorptifitas

b = tebal kuvet

c = konsentrasi

Beberapa langkah utama yang penting dalam analisa dengan spektrofotometri sinar tampak adalah (Ismono, 1979):

1. Molekul harus dapat menyerap sinar tampak
2. Pemilihan panjang gelombang maksimum (λ_{maks})
3. Pembuatan kurva kalibrasi
4. Pengukuran absorbansi

2.6 Hipotesis

Berdasarkan uraian diatas dapat diajukan hipotesis bahwa aktivitas enzim urease dapat dihambat oleh ion Cu^{2+} .

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang selama bulan Juni 2009 sampai Juli 2009

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Kultur mikroorganisme

Bahan utama yang digunakan pada percobaan ini adalah kapang *Schizosaccharomyces Pombe* yang diperoleh dari Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gajah Mada.

3.2.2 Bahan kimia

Semua bahan kimia yang digunakan memiliki derajat kemurnian Pro-analisis (pa) kecuali bila disebutkan lain. Bahan-bahan tersebut antara lain $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , CH_3COOH , CH_3COONa , HgI_2 , NaOH , CuSO_4 , KI , urea, peptone, agar, dekstrosa, kentang, kertas saring, asam trikloroasetat, akuades.

3.2.3 Alat penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Erlenmeyer berukuran 100 mL, 250 mL dan 300 mL, pipet berukuran 1 mL, 5 mL dan 10 mL, pengaduk, tabung reaksi, beaker gelas berukuran 100 mL dan 500 mL, labu ukur (10 mL, 25 mL, 100 mL), pemotong stainless steel, jarum ose, sentrifuse dingin, neraca analitik Metler (type AE 50), pH meter (merk Schoot-Gerate tipe CG.820), kuvet, spectronic 20 (thermo spectonic made in USA model 333142), shaker Nr 2262, oven pembakar Bunsen, penangas air (merk Memmert NR 900660), freezer, magnetic stirrer IKAMAG RH, incubator (merk Herause B5842), autoklav (model No. 25X All American)

3.3 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode percobaan, yang meliputi isolasi, penentuan kondisi optimum enzim urease dan penentuan aktifitas enzim urease yang ditambah dengan inhibitor. Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dimana perlakuan yang di berikan diulang tiga kali dengan parameter yang diteliti adalah aktifitas enzim. Tahapan penelitian yang dilakukan meliputi:

2. Penyiapan media
3. Peremajaan kultur
4. Produksi dan Isolasi enzim urease
5. Penentuan aktivitas enzim urease bebas
5. Uji aktivitas enzim urease dengan penambahan Cu^{2+} pada berbagai konsentrasi
6. Penentuan K_M dan V_M
7. Penentuan jenis dan konstanta inhibisi
8. Analisa Data

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Penyiapan media

Media yang digunakan adalah media padat yang digunakan untuk kultur murni dan media cair untuk ekstraksi enzim urease *Shizzosaccharomyces pombe*.

1. Pembuatan Media Padat

Media padat yang digunakan adalah Potato Dekstrosa Agar (PDA) dengan komposisi:

- | | |
|-------------|---------|
| - Kentang | 50 gram |
| - Dekstrosa | 4 gram |
| - Agar | 4 gram |

Kentang yang diiris tipis direbus dalam akuades 200 mL, kemudian disaring dengan kain saring. Dekstrosa dan agar dilarutkan ke dalam filtrat sampai dengan dipanaskan hingga larut. Kemudian pH diatur pada pH 5,5 dengan menambahkan asam asetat. kemudian ditambahkan 10 mL buffer asetat pH 5,5. Selanjutnya larutan dituangkan pada tabung reaksi kurang lebih 5 mL disterilkan dalam autoclaf pada suhu 250°F , 15 psi selama 15 menit. Setelah itu tabung diletakkan pada posisi miring dan dibiarkan memadat.

2. Pembuatan media cair

Adapun bahan-bahan media cair yang digunakan :

- Pepton 2,50 gram
- Ekstrak yeast 1,25 gram
- NaCl 1,25 gram
- Dekstrosa 2,50 gram
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 4,00 gram

Semua bahan diatas dilarutkan dalam 250 mL akuades dan ditambah 2,5 mL urea 0,2 mM. Kemudian ditambah buffer asetat pH 5,5 dan larutan tersebut disterilkan dalam autoklaf pada suhu $121^{\circ}C$, 15 psi selama 15 menit.

3.4.2 Peremajaan kultur murni

Mikroba dari biakan murni dipindahkan sebanyak satu ose ke dalam PDA steril yang telah disiapkan. Untuk menghindari kontaminasi dari luar maka mulut tabung reaksi disterilkan dengan pembakar bunsen. Kemudian diinkubasi selama 4 hari dalam inkubator pada suhu $30^{\circ}C$.

Kapang yang telah tumbuh dalam media padat PDA miring yang berumur 4 hari diencerkan dengan 5 mL akuades steril, kemudian dikocok. Suspensi spora ini berfungsi sebagai inokulum.

3.4.3 Ekstraksi enzim

Ekstraksi enzim dilakukan dengan cara memindahkan larutan inokulum pada media cair. Pemindahan ini dilakukan dengan menambahkan larutan inokulum sebanyak 20 mL ke dalam 300 mL media cair.

Sebanyak 300 mL media cair dalam erlenmeyer diletakkan di atas shaker 150 rpm pada suhu ruang hingga akhir fasa logaritmik (selama 48 jam). Setelah itu ditambah 50 mL buffer asetat pH 5,5. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm pada suhu ruang selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar dari enzim urease dan diuji aktifitasnya.

3.4.4 Penentuan aktivitas enzim urease bebas

Dipipet 5 mL urea 0,2 mM dan dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan enzim urease sebanyak 1 mL. Setelah itu dilarutkan dalam buffer fosfat pH 8 dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 40 °C. hidrolisis dihentikan dengan menambahkan 10 mL trikloroasetat. Kemudian disentrifugasi selama 15 menit. Amoniak hasil hidrolisis / supernatant dipipet 10 mL dimasukkan labu ukur 25 ml dan ditandabatkan. Dipipet 10 mL dan ditambah pereaksi nessler 0,2 mL. campuran dikocok dan diukur absorbansi dari kompleks yang terbentuk antara amoniak dan pereaksi nessler dengan menggunakan spektronic 20 pada panjang gelombang 400 nm dan dibandingkan dengan larutan standar. Larutan blanko dibuat sama dengan sampel tetapi tanpa menggunakan enzim.

3.4.5 Penentuan aktivitas enzim urease setelah penambahan inhibitor

Dipipet 5,0 mL urea 0,2 mM dan dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan enzim urease sebanyak 1,0 mL dan ditambah larutan Cu²⁺ sebanyak 2 mL. Setelah itu dilarutkan dalam buffer fosfat pH 8 dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 40 °C. hidrolisis dihentikan dengan menambahkan 10 mL trikloroasetat. Kemudian disentrifugasi selama 15 menit. Amoniak hasil hidrolisis / supernatant dipipet 10 mL dimasukkan labu ukur 25 mL dan ditandabatkan. Dipipet 10 mL dan ditambah pereaksi nessler 0,2 mL. campuran dikocok dan diukur absorbansi dari kompleks yang terbentuk antara amoniak dan pereaksi nessler dengan menggunakan spektronic 20 pada panjang gelombang 400 nm dan dibandingkan dengan larutan standar. Larutan blanko dibuat sama dengan sampel tetapi tanpa menggunakan enzim

Pengukuran aktivitas urease dilakukan dengan mengkonversikan nilai absorbansi menjadi konsentrasi ammonia. Setelah nilai konsentrasi ammonia diketahui, maka dimasukkan ke dalam rumus seperti di bawah ini :

$$\text{Aktivitas Enzim} = \frac{[amonia]_{xv}}{Mramonia} \times \frac{fp}{pxq}$$

Keterangan :

v = volume total sampel percobaan pada setiap tabung (mL)

P = jumlah enzim (mL)

q = waktu inkubasi (menit)

f_p = faktor pengenceran

3.4.6 Analisa data

Data hasil penelitian dianalisis dengan ANOVA yaitu pola Rancangan Acak Lengkap dan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil dengan taraf nyata 5% (BNT 5%) dengan pola analisis seperti yang tercantum dalam lampiran.



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dalam penelitian ini telah dilakukan produksi dan isolasi enzim urease dari kapang *Schizosaccharomyces Pombe* serta penentuan pengaruh penambahan ion Cu^{2+} terhadap aktivitas enzim urease. Selain itu juga ditentukan nilai K_M dan V_M dari enzim urease.

Tahapan-tahapan dalam penelitian ini yaitu produksi dan isolasi enzim urease, penentuan panjang gelombang maksimum, pembuatan kurva baku ammonia, penentuan aktivitas enzim urease bebas, penentuan aktivitas enzim urease setelah penambahan Cu^{2+} .

4.1 Produksi dan Isolasi Enzim Urease

Dalam produksi enzim, haruslah dipenuhi suatu kondisi yang memungkinkan pertumbuhan suatu mikroba. Kondisi tersebut meliputi media tempat bakteri itu tumbuh, nutrisi yang diperlukan untuk pertumbuhan, kondisi fisik untuk pertumbuhan optimum seperti pH, suhu, lingkungan, dan ketersediaan O_2 .

Untuk dapat memproduksi enzim dari sel-sel mikroba harus diketahui waktu panen dari enzim itu sendiri, dan hal ini bias diketahui melalui kurva pertumbuhan suatu mikroba yang menunjukkan fase-fase pertumbuhan dari sel-sel mikroba, karena pertumbuhan jumlah sel-sel mikroba juga diikuti dengan penambahan komponen seluler, serta produk-produk hasil metabolisnya.

Dalam penelitian ini isolat *Schizosaccharomyces Pombe* sebelumnya diremajakan pada media padat. Setelah kapang tumbuh yang ditandai terbentuknya koloni-koloni kapang yang berwarna putih agak kecoklatan, selanjutnya media tersebut diencerkan dengan aquades steril sampai 20 mL kemudian ditanam pada 300 mL media cair lalu diinkubasi goyang dengan kecepatan 125 rpm pada suhu ruang ± 25 °C. Penggunaan shaker ini berfungsi menjaga kondisi didalam media cair agar tetap homogen, sirkulasi oksigen merata, meningkatkan kelarutan oksigen dan mempercepat transfer nutrient dan oksigen ke dalam sel sehingga didapatkan lingkungan hidup yang baik bagi pertumbuhan *Schizosaccharomyces Pombe*. Dari penelitian sebelumnya didapatkan data untuk kurva pertumbuhan

kapang *Schizosaccharomyces Pombe* dimana untuk fase adaptasi terjadi pada waktu inkubasi 0-11 jam, fase logaritmik pada waktu inkubasi 11-48 jam dan fase stasioner terjadi setelah 48 jam.

Oleh karena itu Isolasi urease diawali dari pemanenan kapang *Schizosaccharomyces Pombe* yang dilakukan pada awal fase stasioner yaitu pada jam ke-48 (kurang lebih selama 2 hari) karena pada saat ini pertumbuhan kapang mencapai maksimal dimana terjadi penambahan populasi sel secara teratur dan semakin meningkat, pada kondisi ini juga dicapai suatu pertumbuhan yang seimbang, dimana penambahan jumlah sel seiring dengan penambahan komponen seluler serta produk metaboliknya. Pada kondisi ini ditandai dengan keruhnya larutan pada media cair

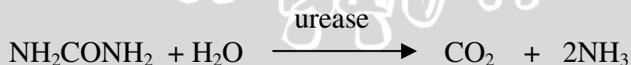
Urease merupakan enzim ekstraseluler sehingga isolasinya dilakukan dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit pada temperatur ruang. Hal ini untuk menghindari kerusakan pada enzim akibat panas yang timbul pada proses putaran. Hasil yang diperoleh berupa endapan dan supernatant yang mengandung ekstrak kasar enzim urease. Dari hasil isolasi ini didapatkan supernatant atau larutan enzim urease yang berwarna agak kekuningan sebanyak 290 mL yang selanjutnya diuji aktivitasnya.

4.2 Uji Aktivitas Enzim Urease

Enzim urease mempunyai nama umum urea amidohidrolase. Enzim ini termasuk dalam kelas hidrolase yaitu enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis.

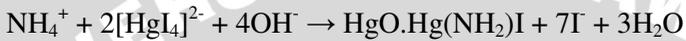
Urease (urea amidohidrolase) merupakan enzim yang mengkatalisis hidrolisis urea menjadi amonia dan karbondioksida (Mobley and Hausinger, 1989)

Adapun kerja dari enzim ini adalah sebagai berikut:



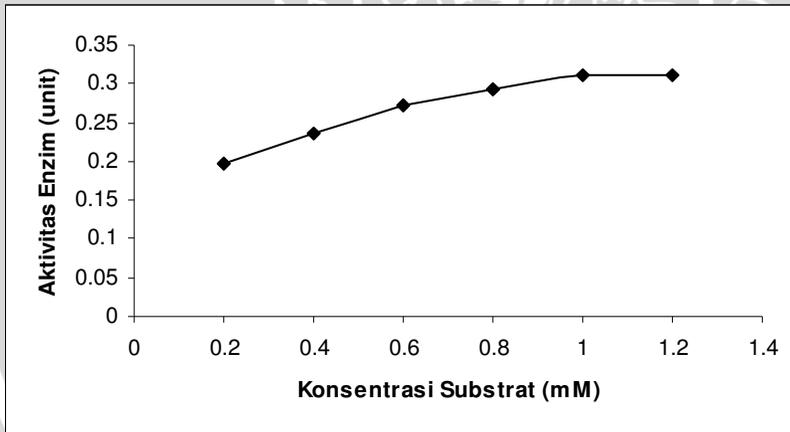
Menurut Fishbein and Carbone (1965), enzim urease mempunyai karakteristik : berat molekul (Mr) 480 kDa. pH optimum 7,4. Enzim ini spesifik untuk urea dan hidroksiurea. Inhibitor berupa logam berat, ion tembaga, ion natrium dan kalium.

Uji aktivitas urease dilakukan menggunakan metode Nessler, pada pH 8, suhu 40⁰C, dengan waktu reaksi selama 10 menit. Hal ini dilakukan sesuai dengan kondisi optimum enzim urease pada penelitian yang dilakukan oleh Hidayati, 2006. Selanjutnya ke dalam larutan ditambah reagen nessler yang akan membentuk senyawa kompleks dengan ammonia sehingga dapat diukur nilai absorbansinya menggunakan spektrometri UV. Adapun kompleks yang terbentuk antara ion ammonium dan reagen nessler adalah sebagai berikut :



Data dan contoh perhitungan aktivitas enzim urease dapat dilihat pada Lampiran 4.

Dari hasil penelitian ini didapatkan hasil kurva seperti di bawah ini :



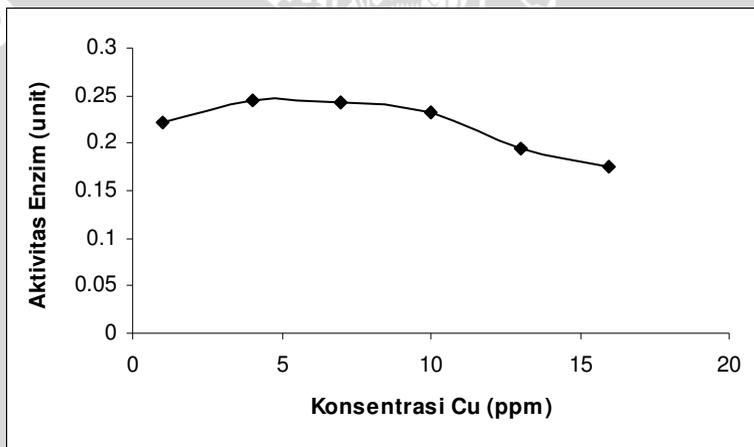
Gambar 4.1 Grafik hubungan antara Laju dengan Konsentrasi Substrat

Dari gambar 4.1 menunjukkan adanya aktivitas enzim urease pada berbagai konsentrasi substrat urea yang ditandai dengan kenaikan kurva seiring dengan bertambahnya konsentrasi substrat.

4.3 Pengaruh Penambahan Ion Cu^{2+} terhadap aktivitas enzim urease

Penambahan ion Cu^{2+} terhadap aktivitas enzim urease menyebabkan penurunan laju aktivitas katalisis enzim urease terhadap substrat urea.

Berdasarkan perhitungan statistik dan Uji BNT 5% (Lampiran 6) diperoleh hasil bahwa $F_{\text{hit}} > F_{\text{tabel}}$. Hal ini berarti bahwa penambahan ion Cu^{2+} memberikan pengaruh yang berbeda terhadap aktivitas enzim urease sehingga dalam hal ini hipotesa awal (H_0) yang menyatakan bahwa tidak ada perbedaan aktivitas enzim urease dengan adanya penambahan ion Cu^{2+} ditolak dengan menerima hipotesa kedua (H_1) yang menyatakan adanya perbedaan terhadap aktivitas urease dengan penambahan ion Cu^{2+} .



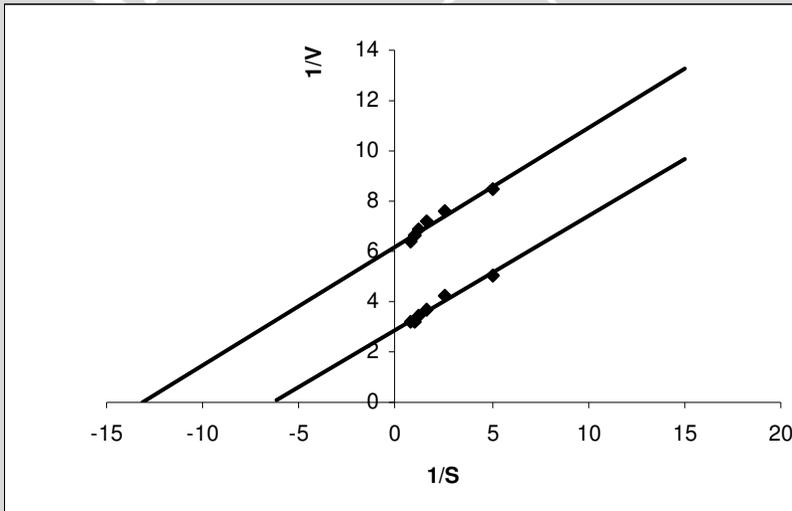
Gambar 4.2 Kurva pengaruh konsentrasi Cu^{2+} terhadap Aktivitas enzim urease

Pada Gambar 4.2 menunjukkan bahwa pada konsentrasi 1 ppm - 4ppm terjadi kenaikan kurva, hal ini dapat diartikan jika pada konsentrasi tersebut ion Cu^{2+} menjadi aktivator atau tidak memberikan efek hambatan yang berarti terhadap aktivitas enzim urease. Pada konsentrasi 7 ppm – 16 ppm mulai terjadi penurunan kurva yang menunjukkan penurunan aktivitas enzim urease sehingga

pada konsentrasi tersebut Ion Cu^{2+} memberikan efek hambatan terhadap aktivitas urease.

Dari uji BNT 5% pada tabel L.6.2 hanya pada konsentarsi 13 ppm dan 16 ppm yang memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap aktivitas urease. Hal ini berarti bahwa pada konsentrasi tersebut pengaruh hambatan terhadap aktivitas urease relative tinggi dibandingkan dengan konsentrasi yang lainnya.

Untuk menentukan jenis penghambatan Cu^{2+} terhadap aktivitas urease dilakukan pengukuran aktivitas enzim urease dengan berbagai konsentrasi substrat dengan penambahan ion Cu^{2+} sebesar 16 ppm dan kemudian diplotkan dengan grafik uji aktivitas tanpa Cu^{2+} yang ditunjukkan pada Gambar 4.3 di bawah ini:



Gambar 4.3 Grafik Lineweaver-Burk dengan Keberadaan Inhibitor unkompetitif

Pada Gambar 4.3 menunjukkan bahwa jenis penghambatan Cu^{2+} terhadap aktivitas urease adalah jenis inhibisi unkompetitif, sehingga dapat dihitung nilai K_i nya seperti pada Lampiran 7 sebesar $13,75 \text{ L.mg}^{-1}$.

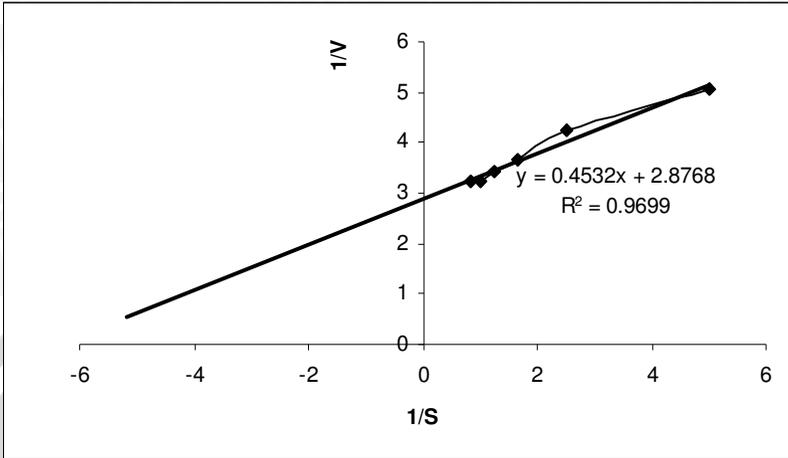
4.4 Penentuan V_M dan K_M

Bagi banyak enzim laju katalisis berubah sesuai dengan konsentrasi substrat. Untuk penentuan laju maksimum (V_M) dan tetapan Michaelis-Menten (K_M) dilakukan dengan mengukur laju katalisis enzim pada berbagai konsentrasi substrat. Dimana laju katalisis (v) didefinisikan sebagai jumlah mol produk yang terbentuk tiap detik (Styrer, 2000).

Penentuan konstanta Michaelis-Menten (K_M) dan laju katalisis maksimum (V_M) dari enzim urease dilakukan pada konsentrasi 0,2 mM; 0,4 mM; 0,6 mM; 0,8 mM; 1,0 mM; 1,2 mM dari substrat.

Pada Gambar 4.1 menunjukkan bahwa pada konsentrasi substrat yang amat rendah laju reaksi pun amat rendah dan laju akan meningkat seiring meningkatnya konsentrasi substrat, hingga pada suatu titik dimana peningkatan konsentrasi substrat tidak diimbangi dengan peningkatan aktivitas enzim. Menurut Martin, *et al.*, (1983), aktivitas reaksi enzimatik meningkat saat konsentrasi substrat meningkat hingga mencapai suatu titik dimana enzim dikatakan “jenuh” dengan substrat. Keadaan ini berarti bahwa kompleks antara enzim-substrat yang terjadi tidak dipengaruhi oleh berapapun jumlah substrat yang ditambahkan karena substrat terdapat dalam jumlah yang melebihi konsentrasi enzim. Dalam keadaan ini aktivitas enzim yang diukur mencapai maksimum

Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim urease dapat digunakan untuk menentukan nilai V_M dan K_M ekstrak kasar enzim urease. Penentuan nilai K_M dapat ditentukan dengan menggunakan persamaan Lineweaver-Burk (Gambar 4.4). Nilai V_M dan K_M ditentukan dengan menggunakan rumus persamaan regresi linier ($Y = aX + b$). Berdasarkan perhitungan pada table L.5.2 diperoleh nilai a (K_M/V_M) sebesar 0,4532 dan nilai b ($1/V_M$) sebesar 2,8768, maka diperoleh nilai K_M sebesar 0,1575 mM dan nilai V_M sebesar 0,2376 unit ($\mu\text{mol}/\text{menit}$).



Gambar 4.4 Kurva hubungan $1/[S]$ terhadap $1/V$

Nilai K_M menerangkan berapa konsentrasi substrat yang diperlukan agar enzim bekerja secara maksimal. Sehingga dari nilai K_M enzim yang didapat, enzim urease bekerja maksimal pada konsentrasi 0,16 mM.

BAB V KESIMPULAN

5.1 Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa ion Cu^{2+} dapat menghambat aktivitas enzim urease dengan jenis inhibisi unkompetitif dengan nilai K_i sebesar $13,75 \text{ L.mg}^{-1}$. Sedangkan untuk nilai K_M didapatkan sebesar $0,16 \text{ mM}$ dan nilai V_m sebesar $0,35 \text{ unit } (\mu\text{mol/menit})$

5.2 Saran

Untuk mendapatkan aktivitas enzim yang lebih tinggi, perlu dilakukan pemurnian enzim terlebih dahulu.



DAFTAR PUSTAKA

- Afandhie, R. dan Nasih, W.Y.,2002, **Ilmu Kesuburan Tanah**, Agrobis, ISBN : 979-21-0468-2, (www.Kanisius.com/URC/book.htm).
- Andrews, R.K., Blakeley, R.L., and Zerner, B., 1984, **Urea and Urease in Advance in Inorganic Biochemistry Volume 6**, Elsevier, New York.
- Booth, J.L., and Vishniac, H.S., 1987. **Urease Testing and Yeast Taxonomy**. Can. J. Microbiol., 1 : 396-404.
- Chaplin, M., 2004, **Potentiometric Biosensors**, Faculty of engineering, Science and The Builth Environment, South Bank University, London.
- Cooper,T.G., 1977, **The Tool of Biochemistry**, John Wiley and Sons, New York pp.391-404.
- Fishbein, W., dan Carbone, P., 1965, **Urease Catalisis.II. Inhibition of Enzyme by Hidroxyurea, Hydroxylamine and Acetohydroxamic**, J.Biol Chem, 2 : 240 – 247.
- Hidayati, E, 2006, **Karakterisasi Enzim Urease Dari kapang *Schizzosaccharomyces Pombe***, Skripsi, Jurusan kimia, Universitas Brawijaya, Malang.
- Ismono, 1979, **Cara-cara Optik Dalam Analisa Kimia**, ITB, Bandung
- Lehninger, A. L., 1990. **Dasar-Dasar Biokimia**. Jilid I. Alih Bahasa: Maggy Thenawijaya. edisi kedua. Erlangga. Jakarta. hal. 235-255.
- Lehninger, A. L., 1978. **Biochemistry**. Second edition. Worth Publishers.New York.

- Martoharsono, 1987, **Biokimia**, Gajah Mada University Press, Yogyakarta
- Martin, D.W., Mayes, D.A., and Rowell, V.W., 1983, **Harper's Review of Biochemistry, 19th edition**, Lange Medical Publication, Maruzen Asia, Singapura.
- Martin, D.W., Mayes, D.A., and Rowell, V.W., 1987, **Biokimia, Harper's Review of Biochemistry**, Alih Bahasa : Iyan Darmawan, Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta, Hal. 87-89
- Mobley, H., and Hausinger, R., 1989, **Microbial Ureases: Significance, Regulation, and Molecular Characterization**, Microbiol Rev 53.
- Punit, K.S., Arvind, M. Srinivasan. 2001, **Characterization of Gelatin-Immobilized Pigeonpea Urease and Preparation of a New Urea Biosensor**. Banaras Hindu University, India.
- Smith, J.E., 1990, **Prinsip Bioteknologi**, PT Gramedia, Jakarta, hal 130-138.
- Shaw, W.H.R., and D.N. Raval, 1961, **J. Amer. Chem. Soc.** **83**, 3184.
- Sudarmadji, 1996, **Teknik Analisa Biokimia**, Penerbit Liberty, Yogyakarta.
- Styrer, L., 2000, **Biokimia**, vol. I, edisi I, Banar, S., dan Setiadi, E., EGC, Penerbit Buku Kedokteran Jakarta.
- Winarno, F.G., 1986. **Enzim Pangan**. cetakan ke-3. PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. hal. 38-52.
- Wirakartakusumah, M.A., 1987, **Isolasi dan Karakterisasi Enzim dari *Aspergillus Niger* serta Pemanfaatan Pembangunan Industri Gula Cair**, IPB, hal :3.

Lampiran 1

PREPARASI LARUTAN

L.1.1 Larutan K_2HPO_4 0,2 M

Untuk membuat larutan K_2HPO_4 0,2 M sebanyak 250 mL, berat padatan yang diperlukan adalah:

$$\begin{aligned}\text{Berat } K_2HPO_4 &= 174,37 \text{ g/mol} \times 0,2 \text{ mol/L} \times 0,25 \text{ L} \\ &= 8,7185 \text{ gram}\end{aligned}$$

Ditimbang 8,7185 gram padatan K_2HPO_4 , dilarutkan dengan akuades dalam beaker glass 100 mL, selanjutnya dituang dalam labu ukur 250 mL dan diencerkan dengan akuades hingga tanda batas.

L.1.2 Larutan KH_2PO_4 0,2 M

Untuk mendapatkan 250 mL larutan KH_2PO_4 0,2 M, berat padatan KH_2PO_4 0,2 M yang harus ditimbang adalah:

$$\begin{aligned}\text{Berat } KH_2PO_4 &= 136,07 \text{ g/mol} \times 0,2 \text{ mol/L} \times 0,25 \text{ L} \\ &= 13,607 \text{ gram}\end{aligned}$$

Ditimbang 13,607 gram padatan KH_2PO_4 dilarutkan dengan akuades dalam beaker glass 100 mL, dituang ke dalam labu ukur 250 mL kemudian diencerkan dengan akuades sampai tanda batas.

L.1.3 Larutan Buffer Fosfat

- Larutan Buffer Fosfat 0,2 M pH 8

- a. Larutan K_2HPO_4 0,2 M 500 mL

$$\begin{aligned}\text{Berat } K_2HPO_4 &= [K_2HPO_4] \cdot Mr K_2HPO_4 \cdot V \text{ larutan} \\ &= 0,2 \text{ mol/L} \times 174,18 \text{ g/mol} \times 0,5 \text{ L} \\ &= 17,418 \text{ g}\end{aligned}$$

- b. Larutan KH_2PO_4 0,2 M 500 mL

$$\begin{aligned}\text{Berat } KH_2PO_4 &= [KH_2PO_4] \cdot Mr KH_2PO_4 \cdot V \text{ larutan} \\ &= 0,2 \text{ mol/L} \times 136,03 \text{ g/mol} \times 0,5 \text{ L} \\ &= 13,603 \text{ g}\end{aligned}$$

$$8 = 7,21 + \log \frac{[\text{K}_2\text{HPO}_4]}{[\text{KH}_2\text{PO}_4]}$$

$$8 = 7,21 + \log a$$

$$\log a = 8 - 7,21 = 0,29$$

$$a = 1,9498$$

$$\frac{[\text{K}_2\text{HPO}_4]}{[\text{KH}_2\text{PO}_4]} = 1,9498$$

$$[\text{K}_2\text{HPO}_4]$$

$$[\text{K}_2\text{HPO}_4] = 1,9498 [\text{KH}_2\text{PO}_4]$$

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$V_{\text{total}} = 1,9498 + 1$$

$$= 2,9498$$

- $V [\text{KH}_2\text{PO}_4] = 1/2,9498 \times 100 \text{ ml} = 33,9 \text{ mL}$
- $V [\text{K}_2\text{HPO}_4] = 100 \text{ ml} - 33,900 \text{ ml} = 66,1 \text{ mL}$.

L.1.4 Larutan Asam Asetat 0,2 M

Untuk membuat larutan CH_3COOH 0,2 M sebanyak 100 mL, yang diperlukan adalah:

$$\text{BJ} = 1,05 \text{ kg/L}$$

$$= 1,05 \cdot 10^3 \text{ g/L}$$

$$[\text{CH}_3\text{COOH}] = 1,05 \cdot 10^3 \text{ g/L} / 60 \text{ g/mol} = 17,5 \text{ M}$$

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$x \cdot 17,5 = 100 \cdot 0,2$$

$$x = 1,15 \text{ mL}$$

Diambil 1,15 mL asam asetat dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, kemudian diencerkan sampai tanda batas sehingga diperoleh larutan asam asetat 0,2 M

L.1.5 Larutan Natrium Asetat 0,2 M

Untuk membuat larutan CH_3COONa 0,2 M sebanyak 100 mL, yang diperlukan adalah:

$$\text{Berat } \text{CH}_3\text{COONa } 0,2 \text{ M} = 82 \text{ g/mol} \times 0,2 \text{ mol/liter}$$

$$= 1,64$$

Ditimbang 1,64 g padatan CH_3COONa dilarutkan dalam beaker glass 100 mL

L.1.6 Buffer Asetat 0,2 M pH 5,5

Untuk memperoleh larutan buffer asetat dengan pH 5,5 sebanyak 100 mL dilakukan dengan cara dimasukkan sebanyak 15 mL larutan asam asetat 0,2 M dalam beaker glass kemudian elektroda pH meter dimasukkan ke dalam larutan tersebut. Selanjutnya ditambahkan tetes demi tetes larutan natrium asetat 0,2 M, sampai pH meter menunjukkan angka 5,5. kemudian campuran tersebut diencerkan dengan akuades hingga 100 mL dimana pH dipertahankan dengan menambahkan asam asetat atau natrium asetat.

L.1.7 Pembuatan Reagen Nessler

Ditimbang 10 gram HgI_2 dan 7 gram KI. Kemudian dilarutkan dalam beaker glass dan ditambahkan 16 gram NaOH. Kemudian dipindahkan dalam labu ukur 50 ml dan ditandabatkan.

L.1.8 Pembuatan Larutan Trikloroasetat 8%

Ditimbang 0,8 g TCA, kemudian dilarutkan dengan akuades steril dalam gelas kimia. Setelah itu dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL dan ditanda bataskan.

L.1.9 Pembuatan Larutan Cu^{2+} dengan konsentrasi 1, 4, 7, 10, 13, 16 ppm

Untuk membuat larutan Cu^{2+} dari Cu_2SO_4 dalam 100 mL pelarut yaitu :

$$ppm = \frac{mgCu}{L}$$

$$1 \text{ ppm} = \frac{mgCu}{0,1L} \rightarrow mg \text{ Cu} = 0,1 \text{ mg} = 0,0001 \text{ g}$$

Maka,

$$\text{Berat CuSO}_4 = \frac{Mr\text{CuSO}_4}{Ar\text{Cu}} \times 0,0001\text{g}$$

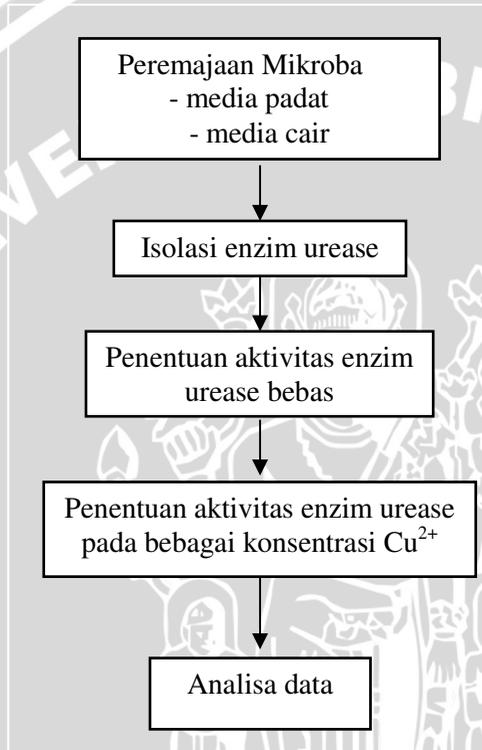
$$\begin{aligned} &= \frac{159,5 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{163,5 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} \times 0,0001\text{g} \\ &= 0,0003 \text{ g} \end{aligned}$$

Dengan cara yang sama akan didapatkan larutan Cu^{2+} dengan konsentrasi 1,4,7,10,13,16 ppm.

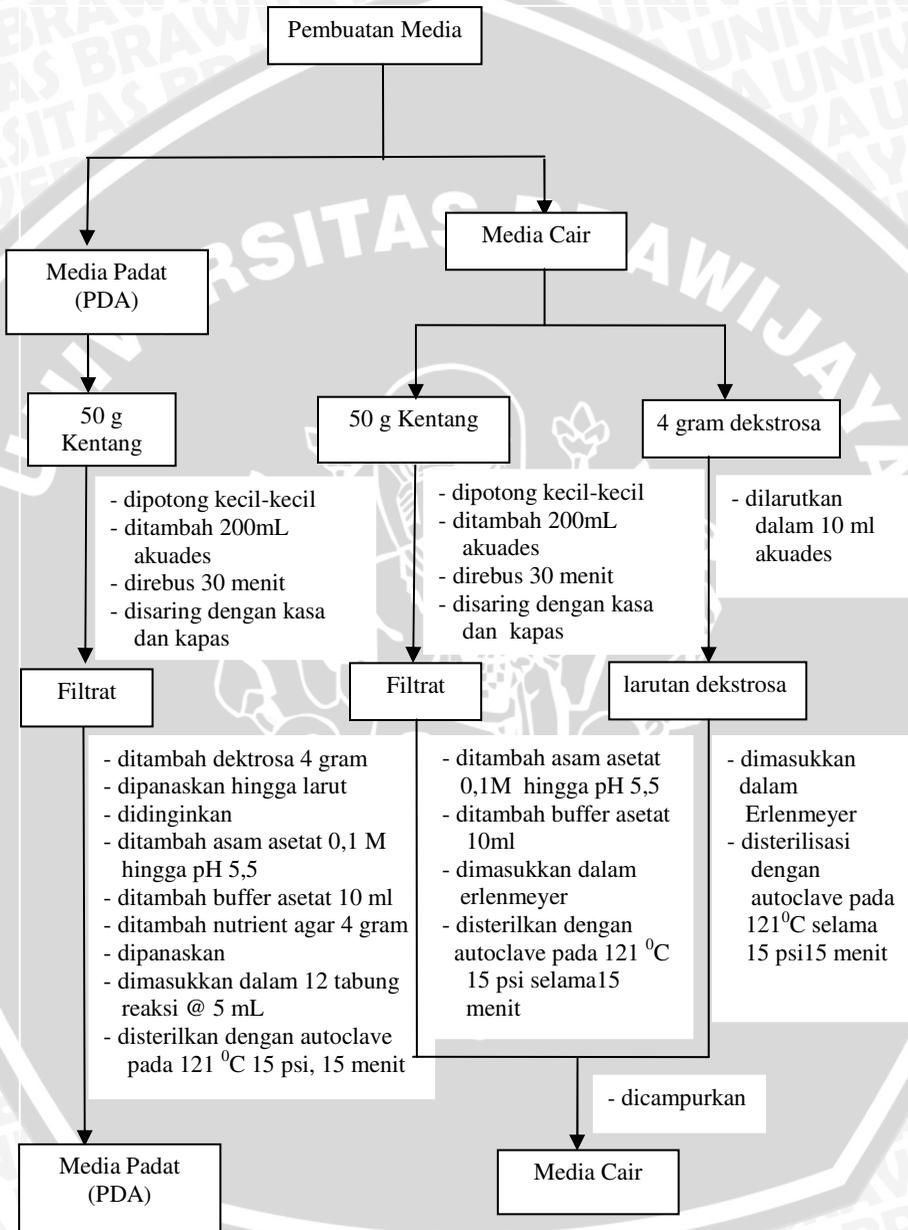


Lampiran 2. Diagram Kerja Metodologi Penelitian

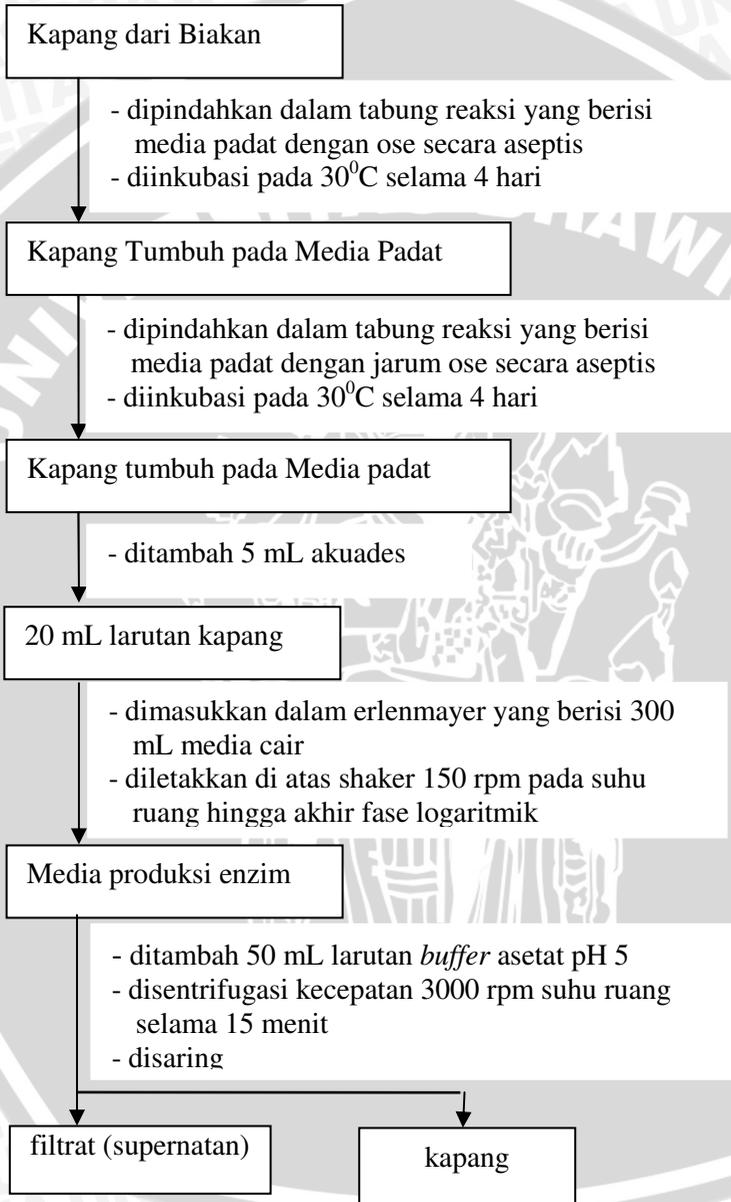
L.2.1 Diagram Alir Penelitian



L.2.2 Pembuatan media pertumbuhan



L.2.3 Isolasi Ekstrak Kasar Enzim Urease dari *Schizosacharomyces pombe*



L.2.4 Uji Aktivitas Enzim Urease

5 mL larutan substrat

- ditambah 1 mL enzim urease hasil isolasi
- ditambah *buffer* pospat pH 8
- diinkubasi selama 10 menit pada 40°C
- ditambah 10 mL trichloroacetat
- ditambah 0,2 mL reagen nessler
- diukur serapannya dengan spektrometri pada panjang gelombang 400 nm

Absorbansi

Larutan blanko diambil urease hasil isolasi diinaktifkan dengan cara memasukkan tabung dalam pemanas suhu 100°C selama 10 menit..

L.2.5 Uji Aktivitas Enzim Urease dengan Penambahan Cu²⁺

5 mL larutan substrat

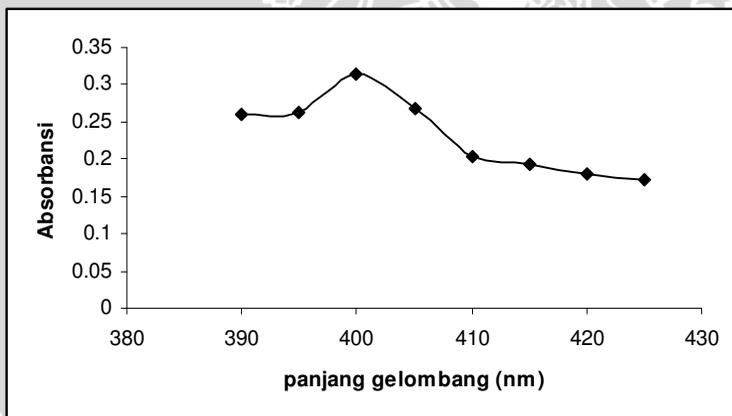
- ditambah 1 mL enzim urease hasil isolasi
- ditambah *buffer* pospat pH 8
- ditambah 2 mL larutan Cu²⁺ (1,4,7,10,13,16 ppm)
- diinkubasi selama 10 menit pada 40°C
- ditambah 10 mL trichloroacetat
- ditambah 0,2 mL reagen nessler
- diukur serapannya dengan spektrometri pada panjang gelombang 400 nm

Absorbansi

Lampiran 3. Data Tabel Pengukuran λ Amonia dan Kurva Baku Amonia

Tabel L.3.1 Absorbansi Larutan ammonia 2 ppm pada berbagai panjang gelombang

λ (nm)	Abs
390	0,261
395	0,262
400	0,315
405	0,267
410	0,203
415	0,194
420	0,181
425	0,172



Gambar L.3.1 Kurva panjang Gelombang Maksimum Kompleks Amonia

Tabel L.3.2 Pembuatan Kurva Baku Amonia

[Amonia]	Abs _{rata-rata}
0	0
1	0,2
2	0,3
3	0,4
4	0,6

Tabel L.3.3 Data Perhitungan Regresi Linier dan Koefisien Kurva Baku Amonia

[amonia] (ppm) X	Rerata Abs. (Λ) Y	X ²	Y ²	XY
0	0	0	0	0
1	0,20	1	0,04	0,20
2	0,30	4	0,09	0,62
3	0,44	9	0,21	1,38
4	0,60	16	0,39	2,48
Σ=10	Σ=1,59	Σ=30	Σ=0,73	Σ=4,68

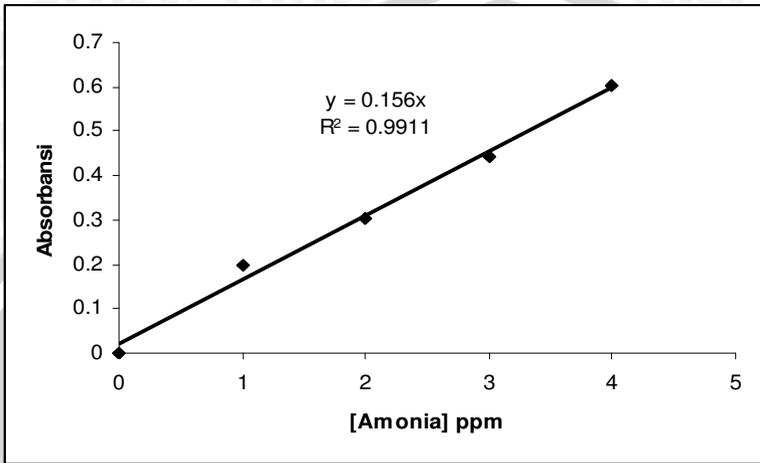
$$Y = ax$$

$$a = \frac{\sum xy}{\sum x^2}$$

$$a = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

$$a = 0,156$$

$$\text{maka } Y = 0,156x$$



Gambar L.3.2 Kurva Baku Kompleks Amonia



Lampiran 4. Data Pengukuran Aktivitas Urease

$$AE = \frac{[amonia]_{xv}}{Mramonia} \times \frac{fp}{pxq}$$

Contoh perhitungan :

Pengukuran aktivitas ekstrak kasar urease pada pH 8 dengan data sebagai berikut :

$$\begin{aligned} \text{Absorbansi} &= 0,21 \\ P &= 1 \text{ mL} \\ V &= 10 \text{ mL} \\ q &= 10 \text{ menit} \end{aligned}$$

Persamaan regresi liner dari kurva baku amonia adalah $y = 0,156x$, maka :

$$0,21 = 0,156x$$

$$x = 1,35 (\mu\text{g} / \text{mL})$$

$$AE = \frac{1,35 (\mu\text{g} / \text{mL}) \times 10 \text{ mL}}{17 (\mu\text{g} / \mu\text{mol}) \times 1 \text{ mL} \times 10 \text{ menit}} \times 2,5 = 0,198 \text{ unit}$$

dengan cara yang sama maka akan didapatkan tabel sebagai berikut :

Tabel L.4.1 Data Aktivitas urease dari berbagai konsentrasi substrat

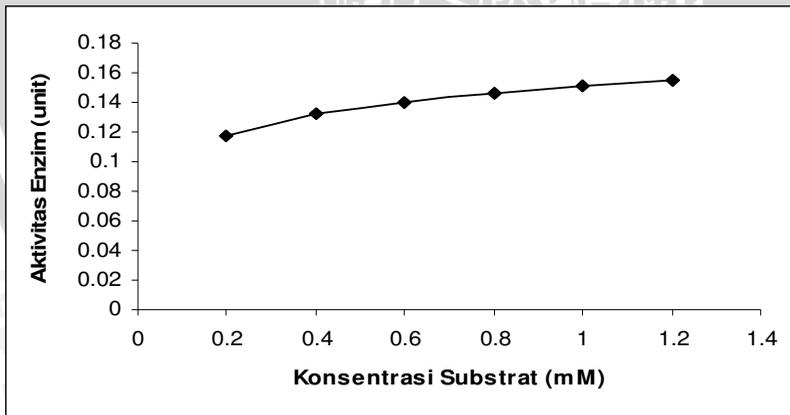
[Substrat]	Absorbansi	[Ammonia]	Aktivitas
0,2	0,21	1,346	0,197
0,4	0,25	1,602	0,235
0,6	0,29	1,858	0,273
0,8	0,31	1,987	0,292
1,0	0,33	2,115	0,311
1,2	0,33	2,115	0,311

Tabel L.4.2 Data aktivitas urease dari berbagai konsentrasi Cu²⁺

[Cu]	Absorbansi	[Ammonia]	Aktivitas
1	0,235	1,506	0,221
4	0,26	1,666	0,245
7	0,258	1,653	0,243
10	0,246	1,576	0,231
13	0,206	1,320	0,194
16	0,187	1,198	0,176

Tabel L.4.3 Data aktivitas urease pada konsentrasi Cu²⁺ 16 ppm

[Substrat]	Absorbansi	[Ammonia]	Aktivitas
0,2	0,125	0,801	0,118
0,4	0,140	0,897	0,132
0,6	0,148	0,949	0,140
0,8	0,155	0,994	0,146
1,0	0,160	1,026	0,151
1,2	0,165	1,058	0,156



Gambar L.4.3 Kurva Aktivitas urease pada konsentrasi Cu²⁺ 16 ppm

Lampiran 5. Penentuan Nilai K_M dan V_{maks}

Tabel L.5.1 Data perlakuan konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim

[Substrat]	Absorbansi	[Ammonia]	Aktivitas
0,2	0,21	1,35	0,19
0,4	0,25	1,60	0,24
0,6	0,29	1,86	0,27
0,8	0,31	1,99	0,29
1,0	0,33	2,12	0,31
1,2	0,33	2,11	0,31

Tabel L.5.2 Data perhitungan Regresi Linier dan Koefisien grafik K_M dan V_{maks}

1/[S]	1/V	X^2	Y^2
5,0	5,05	25,00	25,52
2,5	4,24	6,25	18,00
1,7	3,66	2,78	13,38
1,3	3,42	1,56	11,71
1,0	3,21	1,00	10,33
0,8	3,22	0,69	10,39
$\Sigma=12.25$	$\Sigma=22.81$	$\Sigma=150.06$	$\Sigma=520.45$

$Y = ax$

$$a = \frac{\sum xy}{\sum x^2}$$

$$a = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

$$a = 0,4532$$

$$b = \bar{Y} - a\bar{X}$$

$$b = \frac{\sum y}{n} - a \frac{\sum x}{n}$$

$$b = 2.8768$$

$$\text{maka } \mathbf{Y = 0.4532x + 2.8768}$$

- **Koefisien korelasi (r)**

$$r = \frac{\sum xy}{\sqrt{\sum x^2 \sum y^2}}$$

$$r = \frac{\sum XY - \frac{\sum X \sum Y}{n}}{\sqrt{\left(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}\right) \left(\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}\right)}}$$

$$r = \mathbf{0.9699}$$

Dari grafik Lineweaver-Burk didapatkan persamaan regresi linier $\mathbf{Y = 0.4532x + 2.8768}$,

$$\begin{aligned} \text{maka : } b &= \frac{1}{V_m} \text{ sehingga } V_m = \frac{1}{b} \\ &= \frac{1}{2.8768} \end{aligned}$$

$$= 0.3476 \text{ unit}$$

$$a = \frac{Km}{Vm} \text{ sehingga } K_M = a \cdot V_{\text{maks}}$$

$$= 0.4532 \times 0.3476$$

$$= 0.1575 \text{ mM}$$

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



Lampiran 6. Data Uji pengaruh konsentrasi Cu^{2+} terhadap aktivitas urease

Tabel L.6.1 Data Penentuan F_{hitung}

Ulangan	Penambahan Ion Cu^{2+} (ppm)					
	1ppm	4ppm	7ppm	10ppm	13ppm	16ppm
I	0,220	0,220	0,251	0,240	0,199	0,099
II	0,235	0,250	0,257	0,246	0,207	0,110
III	0,246	0,270	0,263	0,251	0,220	0,250
Σ	0,701	0,740	0,739	0,737	0,626	0,459
rataan	0,235	0,260	0,258	0,246	0,206	0,187

Untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh perlakuan, maka dilakukan uji F dengan langkah-langkah sebagai berikut :

1. Menghitung Faktor Koreksi (FK)

$$\text{Faktor Koreksi (FK)} = \frac{\left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij}) \right]^2}{n.p} = \frac{(4.038)^2}{18} = 0.906$$

2. Menghitung jumlah kuadrat

- a. Jumlah Kuadrat Total

$$\begin{aligned} (\text{JK}_T) &= \left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2 \right] - \text{FK} \\ &= [(0,220)^2 + \dots + (0,250)^2] - 0.906 \\ &= 0.943 - 0.906 = 0.037 \end{aligned}$$

- b. Jumlah Kuadrat Perlakuan

$$\begin{aligned} (\text{JK}_p) &= \frac{\left[\sum_{i=1}^p \left(\sum_{j=1}^n Y_{ij} \right)^2 \right]}{n_i} - \text{FK} \\ &= \frac{[(0,701)^2 + \dots + (0,459)^2]}{3} - 0.906 \\ &= (3.779/3) - 0.906 = 0.0354 \end{aligned}$$

c. Jumlah Kuadrat Galat Percobaan

$$\begin{aligned}(\text{JK}_{\text{GP}}) &= \text{JK}_T - \text{JK}_P \\ &= 0.037 - 0.0354 = 0.016\end{aligned}$$

3 Menghitung Kuadrat Tengah (KT)

$$\begin{aligned}\text{a. Kuadrat Tengah Perlakuan (KT}_P) &= \frac{\text{JK}_P}{\text{db}_{\text{perlakuan}}} \\ &= \frac{0.0354}{5} = 0.0071\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{b. Kuadrat Tengah Galat Percobaan (KT}_{\text{GP}}) &= \frac{\text{JK}_{\text{GP}}}{\text{db}_{\text{percobaan}}} \\ &= \frac{0.016}{12} = 0.0013\end{aligned}$$

4 Menghitung nilai F

$$F_{\text{Hitung}} = \frac{\text{KT}_P}{\text{KT}_{\text{GP}}} = \frac{0.0071}{0.0013} = \mathbf{5,462}$$

5. Ftabel 5% = F(0,05 ; 5,12) = **3,11**

Ftabel 1% = F(0,01 ; 5,12) = **5,06**

Karena $F_{\text{hitung}} > F_{\text{tabel}}$, maka H_0 ditolak, artinya variasi konsentrasi Cu^{2+} berpengaruh terhadap aktivitas urease, untuk mengetahui variasi konsentrasi mana saja yang berpengaruh terhadap aktivitas enzim urease maka dilakukan uji Beda Nyata terkecil (BNT):

$$\begin{aligned}\text{BNT}_{1\%} &= t_{(a/2; \text{dB})} \times (2\text{KT}_{\text{GP}}/n)^{0,5} \\ &= t(0.005; 12) \times (2 \times 0,0013/3)^{0,5} \\ &= 1.782 \times 0.0293 = 0.052\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{BNT}_{5\%} &= t_{(a/2; \text{dB})} \times (2\text{KT}_{\text{GP}}/n)^{0,5} \\ &= t(0.025; 12) \times (2 \times 0,0013/3)^{0,5} \\ &= 2.17 \times 0.0293 = 0.041\end{aligned}$$

Tabel L.6.2 Uji BNT 5% pada variasi [Cu²⁺]

[Cu ²⁺]	[Cu ²⁺]	16	13	10	7	4	1
	Rataan	0,176	0,194	0,231	0,243	0,245	0,221
16	0,176	0	0,018	0,055*	0,067*	0,069*	0,045*
13	0,194		0	0,037	0,049*	0,051*	0,027
10	0,231			0	0,012	0,014	0,010
7	0,243				0	0,002	0,022
4	0,245					0	0,024
1	0,221						0

Keterangan : * lebih besar dari BNT (berbeda nyata) pada $\alpha = 0,05$



Lampiran 7. Konstanta Inhibisi
Tabel L.7.1 Penentuan Konstanta Inhibisi

Untuk penentuan Konstanta Inhibisi (K_i) digunakan nilai V_{maks} dari penambahan ion Cu^{2+} 16 ppm.

1/[S] (X)	1/V (Y)	X ²	Y ²
5,00	8,48	25,00	72,01
2,50	7,57	6,25	57,41
1,66	7,16	2,77	51,37
1,25	6,84	1,56	46,83
1,00	6,63	1,00	43,95
0,83	6,42	0,69	41,33
Σ12,25	Σ43,13	Σ37,28	Σ312,93

Dari hasil perhitungan diperoleh nilai $a = 0,4724$ dan nilai $b = 6,2246$ sehingga nilai V_{maks} dapat diketahui sebesar 0,16065 unit dan nilai K_M sebesar 0,0759 mM

Untuk persamaan K_i yaitu :

$$V'_{maks} = \frac{V_{maks}}{\left[1 + \frac{[I]}{K_i}\right]}$$

$$V'_{maks} + V'_{maks} \frac{[I]}{K_i} = V_{maks}$$

$$V'_{maks} \frac{[I]}{K_i} = V_{maks} - V'_{maks}$$

$$K_i = \frac{V'_{maks} [I]}{V_{maks} - V'_{maks}}$$

$$K_i = \frac{0,16065 \times 16}{0,3476 - 0,16065} = 13,75 \text{ L.mg}^{-1}$$