

**Karakterisasi Enzim Organofosfat Hidrolas (OPH) dari
Pseudomonas putida yang Diproduksi Menggunakan
Substrat Diazinon dan Malathion**

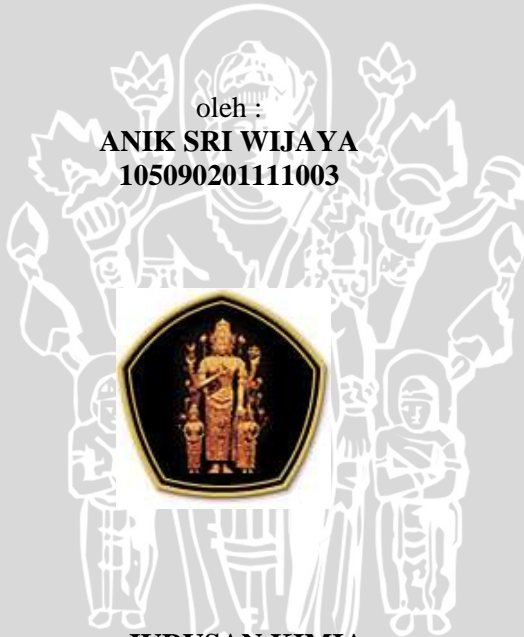
SKRIPSI

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

oleh :

ANIK SRI WIJAYA

105090201111003



JURUSAN KIMIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2014

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Karakterisasi Enzim Organofosfat Hidrolase (OPH)
dari *Pseudomonas putida* yang Diproduksi Menggunakan
Substrat Diazinon dan Malathion**

oleh :

ANIK SRI WIJAYA

105090201111003

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 18 Agustus 2014
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Kimia

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. Sasangka Prasetyawan, MS
NIP. 196304041987011001

Dra. Anna Roosdiana, M.App.Sc
NIP. 195807111992032002

Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Dr. Edi PriyoUtomo, MS
NIP. 195712271986031003

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Anik Sri Wijaya
NIM : 10509020111003
Jurusan : Kimia
Penulis skripsi berjudul : Karakterisasi Enzim Organofosfat Hidrolase (OPH) dari *Pseudomonas putida* yang Diproduksi Menggunakan Substrat Diazinon dan Malathion

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 termaktub diisi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian 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,
Yang menyatakan,

(Anik Sri Wijaya)
NIM. 10509020111003

Karakterisasi Enzim Organofosfat Hidrolase (OPH) dari *Pseudomonas putida* yang Diproduksi Menggunakan Substrat Diazinon dan Malathion

ABSTRAK

Organofosfat hidrolase (OPH) merupakan enzim intraseluler hasil isolasi dari bakteri *Pseudomonas putida*. Enzim ini mampu mendegradasi pestisida golongan organofosfat. Enzim OPH yang telah diisolasi dari *Pseudomonas putida*, dimurnikan dengan metode fraksinasi bertingkat menggunakan amonium sulfat dengan fraksi pengendapan 0-45% dan 45-65%. Uji aktivitas enzim dilakukan dengan mereaksikan OPH dengan substrat diazinon maupun malathion pada berbagai konsentrasi dan pH, pada temperatur ruang selama 30 menit. Penentuan pH optimum OPH dilakukan dengan mengukur aktivitas enzim pada variasi pH (7,5; 8; 8,5; 9; 9,5). Penentuan parameter kinetika reaksi enzimatik (V_{maks} dan K_M) dilakukan dengan mereaksikan enzim OPH pada variasi konsentrasi diazinon (6; 8; 10; 15; 20) ppm dan malathion (10; 15; 20; 25; 30) ppm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi pengendapan 0-45% mempunyai aktivitas optimum 0,035 unit untuk diazinon dan 0,067 unit untuk malathion. pH optimum yang dicapai berdasarkan aktivitas tertinggi untuk diazinon pH 9 dan malathion pH 7,5. Hasil penentuan kinetika reaksi enzimatik OPH didapatkan $V_{maks} = 3,5 \times 10^{-3}$ $\mu\text{mol}/\text{menit}$ dan $K_M = 7,4$ mg/L untuk diazinon, sedangkan untuk malathion $V_{maks} = 16,8 \times 10^{-3}$ $\mu\text{mol}/\text{menit}$ dan $K_M = 19,24$ mg/L.

Kata kunci: OPH, diazinon, malathion, *Pseudomonas putida*

The Characterization of Enzyme Organophosphate Hydrolase (OPH) Produced from *Pseudomonas putida* Using Diazinon and Malathion Substrates

ABSTRACT

Organophosphate hydrolase (OPH) is an intracellular enzyme isolated from *Pseudomonas putida*. This enzyme degrades organophosphate pesticides. OPH isolated from *Pseudomonas putida*, purified by fractionation method using ammonium sulfate with fraction of precipitation 0-45% and 45-65%. Enzyme activity of determined by react OPH with substrate diazinon or malathion at various concentration and pH in room temperature during for 30 minute. Determination optimum pH of OPH was done by measuring enzyme activity at various pH (7.5; 8; 8.5; 9; 9.5). Determination of kinetic parameters (V_{\max} and K_M) performed was done by react OPH with various concentration diazinon (6; 8; 10; 15; 20) ppm and malathion (10; 15; 20; 25; 30) ppm. The results showed that the fraction of 0-45% has optimum activity 0.035 unit for diazinon and 0.067 unit for malathion. The pH optimum for diazinon and malathion in the highest activity in a row to reach pH 9 and pH 7.5. The results determination kinetics of enzymatic reactions of OPH obtained $V_{\max} = 3.5 \times 10^{-3} \mu\text{mol} / \text{minute}$ and $K_M = 7.4 \text{ mg} / \text{L}$ for diazinon, while malathion $V_{\max} = 16.8 \times 10^{-3} \mu\text{mol} / \text{minute}$ and $K_M = 19.24 \text{ mg} / \text{L}$.

Keywords: OPH, diazinon, malathion, *Pseudomonas putida*

KATA PENGANTAR

Puji syukur alhamdulillah penulis persembahkan kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang berjudul **“Karakterisasi Enzim Organofosfat Hidrolase (OPH) dari *Pseudomonas putida* yang Diproduksi Menggunakan Substrat Diazinon dan Malathion”**, sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains jurusan Kimia Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, Malang.

Dapat terselesaikannya skripsi ini tidak terlepas dari dukungan, bantuan serta bimbingan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Dr. Sasangka Prasetyawan, MS selaku dosen pembimbing I yang telah memberi bimbingan dengan penuh kesabaran, memberi dorongan motivasi dan kesediaan waktunya yang selalu membimbing penulis
2. Dra. Anna Roosdiana, M.App.Sc, selaku dosen pembimbing II yang telah memberi bimbingan dengan penuh kesabaran, member dorongan motivasi dan kesediaan waktunya yang selalu membimbing penulis
3. Drs. Danar Purwonugroho, M.Si., selaku dosen pembimbing akademik yang selalu memberi dorongan motivasi
4. Dr. Edi PriyoUtomo, MS, selaku ketua jurusan kimia yang telah memberi dukungan dalam proses penyelesaian skripsi
5. Bapak Maryono, selaku laboran Biokimia yang member kemudahan dalam penelitian ini
6. Bapak Mohammad Herman Djaya dan Ibu Widiati, orang tua yang selalu mendoakan dan bekerja keras untuk keberhasilan saya.
7. Sabrina Wijaya, serta keluarga yang selalu mendukung dan memberi semangat, motivasi dan doa
8. Gusroni Guntur Wibowo yang selalu menemani, mendukung dan memberi motivasi

9. Teman-teman penelitian ku Kartika (cece), Alfi Azizah dan Aninda yang membantu dan memberi semangat dalam menyelesaikan penelitian ini.
10. Sahabat-sahabatku Framdiez yang selalu mendukung dan mendoakan saya dalam menyelesaikan skripsi.
11. Teman – teman kimia UB 2010 yang selalu mendukung.

Tugas akhir ini tentunya masih terdapat banyak kekurangan dan masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran dalam penyempurnaan tugas akhir ini dan perkembangan ilmu pengetahuan. Akhirnya semoga tugas akhir ini bermanfaat bagi pihak yang membacanya.

Malang, Agustus 2014

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah.....	3
1.4 Tujuan Penelitian.....	3
1.5 Manfaat Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Enzim Organofosfat Hidrolase (OPH)	5
2.2 Organofosfat.....	5
2.2.1 Diazinon.....	7
2.2.2 Malathion.....	8
2.3 <i>Pseudomonas putida</i>	9
2.4 Isolasi dan Pemurnian Enzim	9
2.5 Aktivitas Enzim OPH.....	10
2.6 Kadar Protein Enzim OPH	11
2.7 Penentuan Nilai V_{maks} dan K_M	12
BAB III METODOLOGI	15
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	15
3.2 Bahan dan Alat Penelitian	15
3.2.1 Alat	15
3.2.2 Bahan	15
3.3 Tahapan Penelitian	16
3.4 Prosedur Kerja Penelitian.....	16
3.4.1 Pembuatan Media Padat.....	16

3.4.2 Permajaan biakan <i>Pseudomonas putida</i>	16
3.4.3 Pembuatan Media Cair.....	17
3.4.4 Pembuatan biakan aktif (inokulum).....	17
3.4.5 Pembuatan Kurva Pertumbuhan	17
3.4.6 Isolasi Ekstrak Kasar OPH.....	18
3.4.7 Pemurnian Ekstrak Kasar OPH.....	18
3.4.8 Pembuatan Kurva Baku BSA.....	19
3.4.9 Uji Kadar Protein.....	19
3.4.10 Penentuan Aktivitas Spesifik OPH	20
3.4.11 Karakterisasi Enzim	21
3.5 Analisa Data	21
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	22
4.1 Media Produksi dan Peremajaan Kultur Murni <i>Pseudomonas putida</i>	22
4.2 Pembuatan Kurva pertumbuhan	22
4.3 Produksi dan Isolasi Enzim OPH	23
4.4 Pemurnian Ekstrak Kasar Enzim OPH.....	24
4.5 Penentuan Kadar Protein dan Aktivitas Spesifik Enzim OPH ...	25
4.6 Penentuan pH optimum dengan Variasi Konsentrasi Substrat	27
4.6 Penentuan Kinetika Kimia (V_{maks} dan K_M).....	28
BAB V PENUTUP.....	31
5.1 Kesimpulan.....	31
5.2 Saran.....	31
DAFTAR PUSTAKA	32
LAMPIRAN.....	37

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Struktur umum Organofosfat	6
Gambar 2.2	Reaksi Hidrolisis Organofosfat oleh Enzim OPH.....	7
Gambar 2.3	Struktur Diazinon.....	7
Gambar 2.4	Reaksi Hidrolisis Diazinon	7
Gambar 2.5	Struktur Malathion	8
Gambar 2.6	Reaksi Hidrolisis Malathion.....	8
Gambar 2.7	Kurva Michaelis-Menten	13
Gambar 2.8	Kurva Lineweaver dan Burk untuk menentukan V_{maks} dan K_M	14
Gambar 4.1	Kurva Pertumbuhan <i>Pseudomonas putida</i>	23
Gambar 4.2	Mekanisme Reaksi Hidrolisis Organofosfat dengan bantuan enzim OPH	26
Gambar 4.3	Aktivitas spesifik enzim OPH menggunakan substrat diazinon fraksi pengendapan 0-45% pada variasi pH (7,5; 8; 8,5; 9; 9,5).....	27
Gambar 4.4	Aktivitas spesifik enzim OPH menggunakan substrat malathion fraksi pengendapan 0-45% pada variasi pH (7,5; 8; 8,5; 9; 9,5).....	28
Gambar 4.5	Hubungan antara $1/[S]$ dengan $1/V_0$ untuk substrat Diazinon	29
Gambar 4.6	Hubungan antara $1/[S]$ dengan $1/V_0$ untuk substrat Malathion	29
Gambar C.1	Kurva Pertumbuhan <i>Pseudomonas putida</i>	52
Gambar D.1	Kurva Standar BSA.....	53

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Aktivitas Spesifik enzim OPH pada beberapa mikroorganisme	12
Tabel 4.1 Aktivitas spesifik enzim OPH pada fraksi pengendapan amonium sulfat 0-45% dan 45-65% menggunakan substrat diazinon dan malathion.....	26
Tabel B.1 Volume larutan diazinon 40 ppm yang diambil untuk membuat larutan diazinon dengan variasi konsentrasi	45
Tabel B.2 Volume larutan diazinon 40 ppm yang diambil untuk membuat diazinon dengan buffer tris asetat dalam variasi pH	46
Tabel B.3 Volume larutan malathion 145 ppm yang diambil untuk membuat larutan malathion dengan variasi konsentrasi.....	47
Tabel B.4 Volume larutan malathion 145 ppm yang diambil untuk membuat malathion dengan buffer tris asetat dalam variasi pH	48
Tabel B.5 Volume larutan BSA 1000 ppm yang diambil untuk membuat kurva baku BSA	50
Tabel C.1 Data Densitas optik dan waktu pertumbuhan <i>Pseudomonas putida</i>	51
Tabel D.1 Data Absorbansi larutan BSA.....	53
Tabel E.1 Absorbansi Uji Kadar Protein	54
Tabel F.1 Aktivitas Spesifik OPH	55
Tabel G.1 Analisa data aktivitas enzim OPH dengan substrat diazinon pada berbagai pH.....	56
Tabel G.2 Analisa data aktivitas enzim OPH dengan substrat malathion pada berbagai pH.....	56
Tabel H.1 Perhitungan regresi untuk menentukan V_{maks} dan K_M pada substrat diazinon	57
Tabel H.2 Perhitungan regresi untuk menentukan V_{maks} dan K_M pada substrat malathion	58

DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN A Tahapan Penelitian.....	37
LAMPIRAN B Preparasi Larutan	37
B.1 Pembuatan Larutan Konsentrat Garam	37
B.2 Pembuatan Larutan Elemen Renik	38
B.3 Pembuatan Larutan Garam Mineral	38
B.4 Pembuatan Larutan Sukrosa 20%	3
B.5 Pembuatan Larutan Tris 0,1 M.....	38
B.6 Pembuatan Larutan Tris 0,05 M.....	39
B.7 Pembuatan Larutan Asam Asetat 0,5 M.....	39
B.8 Pembuatan Larutan Asam Asetat 0,25 M.....	39
B.9 Pembuatan Larutan Buffer Tris-asetat 0,1 M pH 7,5	40
B.10 Pembuatan Larutan Buffer Tris-asetat 0,1 M pH 8,0	40
B.11 Pembuatan Larutan Buffer Tris-asetat 0,1 M pH 8,5	41
B.12 Pembuatan Larutan Buffer Tris-asetat 0,1 M pH 9,0	41
B.13 Pembuatan Larutan Buffer Tris-asetat 0,1 M pH 9,5.....	42
B.14 Pembuatan Larutan Buffer Tris-asetat 0,05 M pH 8,5.....	43
B.15 Pembuatan Larutan Buffer Tris-asetat 0,02 M pH 7,5.....	43
B.16 Pembuatan Larutan NaOH 10% (w/v)	43
B.17 Pembuatan Larutan Biuret.....	44
B.18 Pembuatan Larutan Uji Organofosfat	44
B.18.1 Pembuatan Larutan Diazinon 40 ppm...	44
B.18.2 Pembuatan Larutan uji diazinon dalam buffer tris asetat pH 8,5 0,005 M.....	44
B.18.3 Pembuatan Larutan uji diazinon dalam buffer tris asetat pH 7,5 – 9,5	45
B.18.4 Pembuatan Larutan Malathion 145 ppm 46	

B.18.5 Pembuatan Larutan uji malathion dalam buffer tris asetat pH 8,5 0,005 M	47
B.18.6 Pembuatan Larutan uji malathion dalam buffer tris asetat pH 7,5 – 9,5	48
B.19 Penambahan amonium sulfat fraksi pengendapan 0-45% dan 45 – 65% pada Ekstrak kasar OPH	48
B.19.1Tabel Pengendapan Amonium Sulfat	49
B.20 Penentuan Kadar Protein Menggunakan Metode Biuret.....	49
B.21 Pembuatan LarutanBSA	49
B.21.1Pembuatan LarutanBSA 10000 ppm	49
B.21.2Pembuatan Larutan BSA 5000 ppm	50
LAMPIRAN C Penentuan Pertumbuhan bakteri	
<i>Pseudomonas putida</i>	51
LAMPIRAN D Penentuan Kurva Baku BSA	53
LAMPIRAN E Penentuan Kadar Protein	53
E.1 Perhitungan Kadar Protein.....	53
LAMPIRAN F Penentuan Aktivitas Spesifik	54
F.1 Perhitungan Aktivitas Spesifik OPH.....	54
LAMPIRAN G Penentuan pH optimum.....	56
LAMPIRAN H Penentuan V_{maks} dan K_M	57

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Enzim merupakan biomolekul protein sebagai katalis pada proses biokimia yang dapat terjadi di dalam maupun di luar sel, serta bersifat efisien karena dapat menurunkan energi aktivasi dari reaksi kimia [1]. Enzim memiliki sifat-sifat unik, yaitu dapat aktif dalam jumlah yang sangat kecil dan aksi katalitiknya spesifik [2]. Hidrolase merupakan enzim yang bekerja sebagai katalis pada reaksi hidrolisis suatu substrat atau pemecahan substrat dengan pertolongan molekul air. Ada tiga jenis hidrolase, yaitu yang memecah ikatan ester, memecah glikosida dan yang memecah ikatan peptida. Beberapa enzim sebagai contoh ialah esterase, lipase, fosfatase, amilase, dan amino peptidase [1].

Organofosfat hidrolase (OPH) merupakan protein homodimerik dan enzim yang mengandung logam dengan berat molekul 72 kDa. Organofosfat hidrolase (OPH) mampu mengkatalisis reaksi hidrolisis pestisida organofosfat. Pada reaksi hidrolisis ini, enzim akan mengkatalisis organofosfat dan menghidrolisis ikatan fosfoester dari organofosfat serta mengurangi toksisitas organofosfat. Satu jenis OPH biasanya dapat menghidrolisis berbagai organofosfat seperti diazinon dan malathion. Detoksifikasi enzimatik organofosfat memiliki cara potensial untuk menghilangkan residu organofosfat [3]. Berbagai bakteri organofosfat yang dapat menurunkan toksisitas organofosfat, termasuk *Pseudomonas diminuta* MG, *Flavobacterium* sp, *Arthrobacter* sp, *Penicillium lilacinum* BP303, telah diisolasi dari lingkungan yang terdapat senyawa organofosfat. Bakteri ini dapat tumbuh di tanah yang mengandung organofosfat dan menggunakan senyawa organofosfat sebagai sumber karbon. *P. diminuta* MG dan beberapa spesies *Pseudomonas* lain seperti *Pseudomonas* sp. WBC – 3 dan *Pseudomonas putida* yang memiliki kemampuan untuk mendegradasi fosfotriester [3]. Pada penelitian biologi molekuler, OPH telah dikembangkan terus-menerus. Sampai sekarang, beberapa OPH telah diisolasi dan dimurnikan dari berbagai mikroorganisme. Beberapa jenis gen OPH telah dikloning dan dilakukan pada *Escherichia coli*. Modifikasi molekul OPH bertujuan untuk

memperluas spesifisitas substrat dan meningkatkan efisiensi hidrolisis organofosfat [4].

Organofosfat merupakan pestisida yang banyak digunakan, bersifat heterogen dan merupakan turunan asam fosfat. Saat ini ada 140 senyawa organofosfat yang digunakan sebagai pestisida dan sebagai regulator pertumbuhan tanaman di seluruh dunia. Senyawa ini adalah komponen yang terdiri dari lebih 100 jenis pestisida tersedia secara komersial (seperti Paraoxon , Parathion , coumaphos pestisida dan Diazinon) [5]. Organofosfat merupakan jenis pestisida yang direkomendasikan oleh Departemen pertanian Republik Indonesia. Penggunaan Pestisida organofosfat seperti diazinon dan malathion telah banyak dimanfaatkan untuk membunuh hama pada hasil pertanian terutama sayuran, namun penggunaan pestisida berlebihan dari batas maksimum residu yang diperbolehkan dapat memberikan dampak negatif bagi makhluk hidup. Paparan residu organofosfat dapat menghambat aktivitas asetilcholinesterase sehingga transmisi impuls syaraf menjadi terganggu [6]. Metode umum yang digunakan untuk analisis organofosfat adalah biosensor. Biosensor merupakan salah satu metode analitik yang menggabungkan unsur biorekognisi dan transduser fisika untuk deteksi senyawa target. Enzim merupakan unsur biologi dalam biosensor yang bereaksi secara selektif dengan substratnya [7]. Pengembangan biosensor telah banyak dilakukan dengan cara menggabungkan enzim dengan beragam jenis transduser pada biosensor amperometri, salah satunya menggunakan enzim organofosfat hidrolase (OPH). Kinerja biosensor amperometri didasarkan pada aktivitas spesifik enzim OPH [8].

Aktivitas spesifik enzim yang dimurnikan mempunyai aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak kasarnya sehingga menghasilkan suatu analisis yang lebih selektif dan sensitif. Enzim murni dapat diperoleh dengan mengisolasi enzim dari jaringan sehingga komponen sel dapat terpisahkan dengan enzim. Kecepatan reaksi yang diukur pada suatu enzim sesuai dengan jumlah enzim yang ada. Satuan aktivitas enzim dinyatakan dalam unit. Satu unit menyatakan jumlah enzim yang mengubah 1 mmol substrat per menit pada kondisi tertentu [1].

Pada penelitian ini dipelajari lebih lanjut mengenai isolasi, pemurnian dan karakterisasi enzim OPH dengan menggunakan

substrat diazinon dan malathion. Tahap isolasi diawali dengan pembuatan ekstrak kasar enzim OPH, dilanjutkan dengan metode pemurnian salting out dan dialisis. Metode pemurnian yang digunakan pada penelitian ini adalah metode pengendapan bertingkat menggunakan amonium sulfat dengan fraksi 0-45% dan 45-65% pada temperatur 4 °C [9], yang didasarkan pada perbedaan kelarutan protein dimana berat molekul protein 72 kDa [3]. Serta untuk mengetahui kemampuan enzim OPH dalam mendegradasi pestisida organofosfat diazinon dan malathion yang meliputi pengaruh variasi konsentrasi dan pH untuk menentukan hasil optimumnya dari bakteri *Pseudomonas putida*. *Pseudomonas putida* yang merupakan salah satu jenis bakteri dari Gamma proteobacteria.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, dapat dirumuskan beberapa rumusan masalah yaitu :

1. Bagaimana kemampuan enzim OPH untuk mendegradasi substrat organofosfat diazinon dan malathion ?
2. Bagaimana karakterisasi kerja optimum OPH dengan variasi konsentrasi dan pH pada pemurnian enzim kasar OPH terhadap substrat diazinon dan malathion ?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan perumusan masalah di atas, maka penelitian ini memiliki batasan masalah sebagai berikut:

1. Pemurnian enzim OPH menggunakan fraksi pengendapan amonium sulfat bertingkat 0-45% dan 45-65%.
2. Temperatur yang digunakan temperatur ruang
3. Waktu inkubasi 30 menit
4. Karakterisasi enzim dengan pengaruh konsentrasi substrat yang digunakan untuk diazinon (6; 8; 10; 15; 20) ppm dan malathion (10; 15; 20; 25; 30) ppm
5. pengaruh pH yang digunakan pH (7,5; 8; 8,5; 9; 9,5)

1.4 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui kemampuan enzim OPH dalam mendegradasi substrat organofosfat diazinon dan malathion.

- Mengetahui kerja optimum enzim OPH dengan pengaruh variasi konsentrasi dan pH pada pemurnian enzim kasar OPH terhadap substrat diazinon dan malathion.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai kemampuan enzim OPH dalam mendegradasi organofosfat diazinon dan malathion serta mengetahui konsentrasi dan pH optimum dari enzim OPH dengan berbagai variasi.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Enzim Organofosfat Hidrolase

Enzim adalah golongan protein yang paling banyak terdapat dalam sel makhluk hidup dan berfungsi sebagai katalisator reaksi biokimia yang secara kolektif membentuk metabolis perantara dari sel [10].

Metode sentrifugasi digunakan untuk mengisolasi enzim dari mikroorganisme. Pemisahan partikel dari larutan pada metode sentrifugasi merupakan operasi utama dalam isolasi enzim dan termasuk pemisahan sel – sel dari medium biakan [11].

Organofosfat hidrolase (OPH) merupakan enzim yang mampu mengkatalisis reaksi hidrolisis pestisidaorganofosfat. Pada reaksi hidrolisis ini, enzim akan mengkatalisis organofosfat dan menghidrolisis ikatan fosfoester dari organofosfat serta mengurangi toksisitas organofosfat [3].

Organofosfat hidrolase merupakan protein homodimerik dan enzim yang mengandung logam denganberat molekul 72 kDa.OPH menghidrolisis berbagai macam organofosfat dengan memproduksi produk dengan tingkat beracun rendah. OPH memiliki aplikasi detoksifikasi dan dekontaminasi organofosfat dalam bidang pertanian. Hal ini membuat OPH tepat untuk biodegradasi senyawa organofosfat [4].

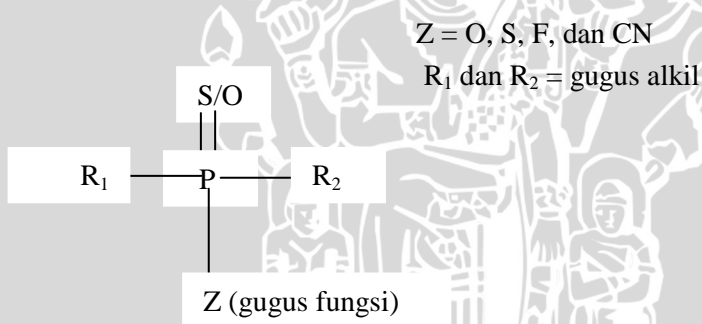
OPH dapat diisolasi dari berbagai bakteri yang mendegradasi pestisida, termasuk *Pseudomonas diminuta* MG dan beberapa spesies *Pseudomonas* lain seperti *Pseudomonas sp* dan *Pseudomonas putida* memiliki kemampuan untuk mendegradasi fosfotriesters. Dalam proses hidrolisis terjadi pemutusanikatan antara C dan P sehingga *Pseudomonas sp* dapat memanfaatkan kedua unsur tersebut sebagai sumber karbon dan fosfat untuk memperoleh energi. Enzim ini dapat diisolasi dari *Pseudomonas putida* dengan pH optimum antara pH 8-9 dan temperatur optimum antara 25-30°C [3].

2.2 Organofosfat

Organofosfat adalah senyawa buatan manusia yang beracun dan merupakan senyawa kimiayang digunakan sebagai pestisida. Di seluruh dunia, lima miliar pon pestisida digunakan setiap tahun,

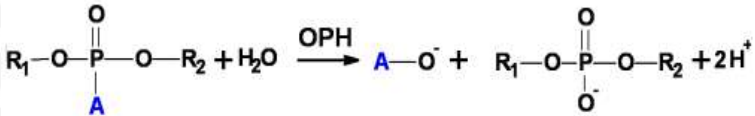
pestisida organofosfat merupakan 20-38 % dari total pestisida yang sering digunakan, yang paling umum digunakan insektisida organofosfat di Amerika Serikat adalah malathion, rendahnya tingkat kontaminasi organofosfat umumnya ditemukan di habitat alam, dalam rantai makanan, dan air. Senyawa organofosfat mengurangi toksisitas dengan menghambat enzim acetylcholinesterase (AChE) yang dapat menyebabkan berbagai penyakit, termasuk sesak nafas dan kematian [12]. Organofosfat merupakan jenis pestisida yang mengandung unsur fosfat, karbon dan hidrogen. Contoh pestisida yang tergolong organofosfat antara lain diazinon, malathion, klorpyrifos, profenofos, tetra etil pirofosfat (TEEP).

Pestisida organofosfat terdiri dari satu gugus atau lebih fosfor yang terikat pada molekul organik. Organofosfat dibuat dari suatu molekul organik yang direaksikan dengan fosforilat dengan rumus struktur seperti pada Gambar 2.1 [14]. Pada umumnya senyawa – senyawa organofosfat merupakan senyawa yang cepat terhidrolisis bila tercampur dengan air dan sedikit meninggalkan residu apabila disempatkan [13].



Gambar 2.1 Struktur Umum Organofosfat

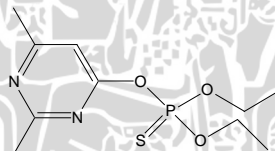
Reaksi hidrolisis pada organofosfat secara umum ditunjukkan pada Gambar 2.2 [15] :



Gambar 2.2 Reaksi Hidrolisis Organofosfat Oleh Enzim OPH. A=gugus fungsi "R-O,R-S, F atau CN.

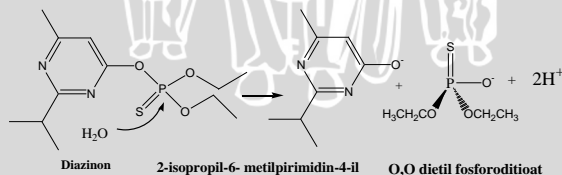
2.2.1 Diazinon

Diazinon memiliki nama IUPAC O,O-dietil-O-(2-isopropil-4-metil-6-pirimidil) fosforotioat dengan rumus struktur seperti pada Gambar 2.3 [15]. Diazinon merupakan cairan tidak berwarna yang larut sempurna di dalam pelarut organik seperti kloroform, etanol, aseton, astitonitril, dan benzena. Diazinon termasuk jenis organofosfat yang memiliki tingkat bahaya sedang atau kelas II. Di Indonesia residu diazinon dibatasi. Batas maksimum residu pada beras dan sayuran adalah 0,1 mg/kg dan 0,5 mg/kg [6]. Kelarutan diazinon dalam air 0,04 g/L pada 20°C dan 30°C, pernah dilaporkan juga 0,054 dan 0,069 g/L pada rentang temperatur 20-40°C. Toksisitas diazinon akan menurun saat terhidrolisis.



Gambar 2.3 Struktur diazinon

Reaksi hidrolisis diazinon ditunjukkan pada Gambar 2.4 [16] :

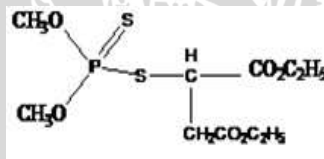


Gambar 2.4 Reaksi Hidrolisis Diazinon

Diazinon mengalami hidrolisis dengan cepat pada $\text{pH} < 3,1$ dan $\text{pH} > 10,4$, memiliki $t_{1/2} = 38$ hari pada $\text{pH} 5$, $t_{1/2} = 78$ hari pada $\text{pH} 7$, dan $t_{1/2} = 40$ hari pada $\text{pH} 9$ [17].

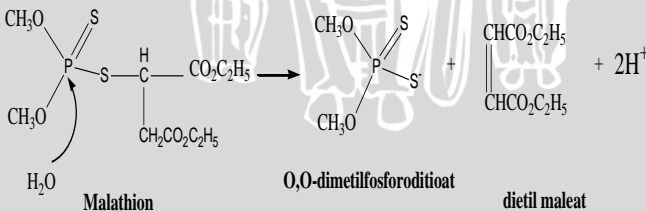
2.2.2 Malathion

Malathion termasuk kelompok insektisida organofosfor yang dipergunakan secara luas untuk membasmi serangga dalam bidang kesehatan, pertanian, peternakan. Nama IUPAC Malathion O,O – dimetil–S-1,2-bis etoksi karbonil etil phosphorodithionate dengan rumus struktur seperti Gambar 2.5 [18]. Produk yang mengandung malathion digunakan di luar ruangan untuk mengontrol berbagai macam serangga dalam pengaturan pertanian dan sekitar rumah-rumah penduduk. Dengan toksisitas LD_{50} 1300 mg/Kg [18]. Toksisitas malathion dapat menghambat aktivitas asetil cholinesterase dengan cara mengikat asetil cholinesterase, menyebabkan gangguan pada transmisi impuls saraf, dan akumulasi asetilkolin pada sambungan sinaptik. Malathion sangat berperan dalam membasmi nyamuk dan sebagai pengganti insektisida organoklorin. Malathion termasuk jenis organofosfat yang memiliki tingkat bahaya sedang atau kelas II.



Gambar 2.5 Struktur Malathion

Serta reaksi hidrolisis malathion ditunjukkan pada Gambar 2.6 [19] :



Gambar 2.6 Reaksi Hidrolisis Malathion

Pada penelitian ini, penentuan kadar organofosfat dilakukan dengan uji aktivitas enzim. Dasar pengukuran didasarkan pada perubahan komposisi larutan akibat reaksi hidrolisis organofosfat yang dikatalisis oleh enzim organofosfat hidrolase (OPH) hasil isolasi dari *Pseudomonas putida*.

Enzim OPH saat penentuan residu diazinon dan malathion, diperoleh melalui reaksi katalitik hidrolisis organofosfatnya. Dalam reaksi katalitik organofosfat oleh OPH, dua proton dilepaskan selama reaksi hidrolisis. Pada kondisi pH dan temperature optimum, OPH akan menghidrolisis diazinon menjadi O,O dietil fosforotioat dan 2-isopropil-6-metil pirimidin-4-il dan malathion menjadi O,O dimetilfosfoditioat dan dietil maleat [20].

2.3 *Pseudomonas putida*

Genus *Pseudomonas* termasuk gram negatif dan banyak terdapat di tanah dan air. Berbagai spesies *Pseudomonas* dapat menggunakan senyawa tertentu sebagai sumber karbon dan media pertumbuhan, salah satunya adalah *Pseudomonas putida*. Bakteri ini tumbuh pada temperatur optimal 25 - 30°C tidak tumbuh pada 41°C. Bakteri berbentuk batang ini diisolasi dari tanah dan air setelah ditumbuhkan pada media mineral dengan berbagai macam sumber karbon. *Pseudomonas putida* mempunyai klasifikasi sebagai berikut [11] :

Superkingdom	: Bacteria
Kingdom	: Eubacteria
Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Gamma proteobacteria
Ordo	: Pseudomonadales
Famili	: Pseudomonadaceae
Genus	: <i>Pseudomonas</i>
Spesies	: <i>Pseudomonas putida</i>

Pseudomonas putida memiliki bermacam metabolisme yang dapat memperbaiki polutan organik yang beracun seperti karbon aromatik dan karbon alifatik. Bakteri ini berperan dalam pemeliharaan kualitas lingkungan dalam tanah dan air [11].

2.4 Isolasi dan Pemurnian Enzim

Isolasi enzim bergantung dari asal sumbernya yaitu hewan atau tumbuhan dan keberadaan enzim tersebut ekstraseluler atau

intraseluler [19]. Enzim yang diisolasi dari hewan, tumbuhan dan mikroorganisme dapat dilakukan dengan beberapa cara, antara lain metode ekstraksi, presipitasi, koagulasi, sentrifugasi, filtrasi dan kromatografi [21]. Isolasi enzim ekstraseluler didasarkan pada sifat fisik dan kimianya tidak membutuhkan proses pemecahan dinding sel, berbeda dengan enzim intraseluler prosesnya membutuhkan tahapan pemecahan dinding sel [22].

Pemurnian enzim bertujuan untuk memisahkan protein enzim dari protein non enzim, sehingga sisi aktif dari protein tersebut tidak terganggu. Adapun teknik pemurnian enzim meliputi pengendapan fraksional dengan perubahan pH, denaturasi fraksional dengan pemanasan, pengendapan fraksional dengan pelarut organik ataupun dengan garam anorganik seperti $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dan kromatografi kolom yang meliputi kromatografi filtrasi gel dan kromatografi penukar ion [23].

Teknik pemurnian enzim salah satunya adalah pengendapan oleh garam anorganik seperti amonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ [23]. Amonium sulfat merupakan garam dengan kelarutan tinggi yang mudah menarik molekul air yang mensolvasi protein. Air akan berinteraksi dengan garam, sehingga protein akan mengendap dan dapat dipisahkan, proses ini disebut dengan *salting out* [24].

Dialisis merupakan teknik yang digunakan untuk pertukaran buffer enzim dan pada waktu yang bersamaan juga akan membuang kelebihan garam. Pada proses dialisis, perpindahan garam amonium sulfat dengan berat molekul yang lebih kecil dari sampel menuju ke dalam larutan buffer dengan konsentrasi yang lebih rendah dari sampel [25].

2.5 Pengujian Aktivitas Enzim OPH

OPH adalah enzim yang dapat mengkatalisis reaksi hidrolisis organofosfat menjadi organofosfat hidrolase dan menghidrolisis ikatan fosfoester dari Organofosfat serta mengurangi toksisitas Organofosfat [6]. Dalam proses hidrolisis terjadi pemutusan ikatan antara C dan P sehingga *Pseudomonas sp* dapat memanfaatkan kedua unsur tersebut sebagai sumber karbon dan fosfat untuk memperoleh energi [3].

Aktivitas enzim merupakan suatu ukuran kuantitas dari aktivitas enzim per volume larutan, serta unit aktivitas enzim dinyatakan

sebagai jumlah mol substrat yang dikonversi per unit waktu = 1 $\mu\text{mol/ menit}$. Aktivitas enzim OPH ini ditentukan dengan cara mengujikan OPH dengan substrat diazinon dan malathion yang didasarkan pada perubahan komposisi larutan akibat reaksi hidrolisis organofosfat yang dikatalisis oleh enzim organofosfat hidrolase (OPH) hasil isolasi dari *pseudomonas putida* [26]. Untuk melihat besarnya satu unit aktifitas enzim tersebut digunakan rumus pada persamaan 2.1 [27] :

$$AE = \frac{[P]xV}{Mr \text{ substrat}} \times \frac{fp}{p \times q} \quad (2.1)$$

dimana :

- AE = aktifitas enzim ($\mu\text{mol.menit}^{-1}$)
- [P] = konsentrasi produk (mmol. L^{-1})
- V = volume total sampel percobaan pada tiap tabung (mL)
- q = waktu reaksi (menit)
- p = volume ekstrak kasar enzim (mL)
- fp = faktor pengenceran

2.6 Kadar Protein Enzim

Kadar protein enzim ini dapat ditentukan dengan metode spektrofotometri menggunakan reagen Biuret. Penggunaan reagen Biuret didasarkan pada pengukuran absorbansi cahaya oleh senyawa kompleks yang berwarna ungu. Pengukuran kadar protein bertujuan untuk mengetahui aktivitas enzim spesifik.

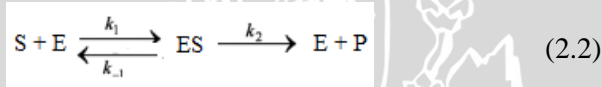
Penentuan aktivitas spesifik OPH dalam tiap sampel diukur konsentrasi proteinnya. Pengukuran absorbansi protein sampel dilakukan dengan pembuatan kurva standar protein. Serapan sampel diukur pada panjang gelombang 540 nm. Perhitungan konsentrasi protein selanjutnya digunakan untuk menentukan aktivitas spesifik OPH (U/mg protein). Seperti terlihat pada Tabel 2.1 aktivitas spesifik enzim organofosfat hidrolase terbesar pada bakteri *Pseudomonas putida*. Hal-hal yang mempengaruhi pengukuran kadar protein adalah pH, waktu inkubasi, dan konsentrasi substrat [28].

Tabel 2.1 Aktivitas Spesifik enzim organofosfat hidrolase pada beberapa mikroorganisme

Mikroorganisme		Aktivitas spesifik
<i>Pseudomonas putida</i>	[29]	1,444 U/mg
<i>Pseudomonas Aeruginase</i>	[30]	1,119 U/mg
<i>Pseudomonas diminuta</i>	[31]	0,026 U/mg
<i>Eshcherichia colli</i>	[32]	0,694 U/mg

2.7 Penentuan nilai V_{maks} dan K_M Enzim OPH

Enzim merupakan makromolekul kompleks yang sebagian besar tersusun atas protein dan memiliki fungsi katalitik tertentu [33]. Mekanisme katalitik dari enzim dapat dijelaskan oleh persamaan 2.2 [14] :

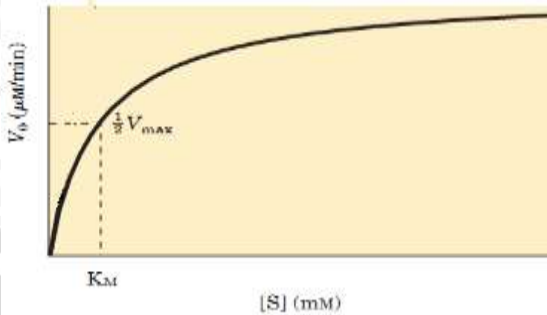


Dimana S = substrat ; E = Enzim ; ES = Kompleks Enzim – substrat ; P = Produk ; k_1 = Laju pembentukan enzim – substrat ; k_{-1} = laju disosiasi kompleks enzim – substrat ; k_2 = laju pembentukan produk. Laju reaksi keseluruhan ditentukan menggunakan pendekatan keadaan tunak atau tetap, dimana laju pembentukan intermediet ES sama dengan nol. Jika laju dinyatakan dengan laju pembentukan produk, maka diperoleh persamaan 2.3 [34] :

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2 [ES] \tag{2.3}$$

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{k_2 [E]_0}{1 + K_m/[S]_0}$$

Berdasarkan persamaan 2.3, tampak bahwa kecepatan pembentukan produk dipengaruhi oleh konsentrasi enzim dan substrat serta K_M . K_M adalah tetapan Michaelis-Menten, yaitu konsentrasi substrat saat kecepatan reaksi mencapai 1/2 kecepatan maksimal. Hal ini dapat dilihat dengan lebih jelas pada Gambar 2.7 [34].



Gambar 2.7. Kurva hubungan antara konsentrasi substrat dengan kecepatan awal reaksi

Penentuan nilai V_{maks} dan K_M , Lineweaver dan Burk mengadakan penyederhanaan terhadap rumus Michaelis. Nilai V_{maks} dan K_M dapat ditentukan dengan mengadakan percobaan penentuan kecepatan reaksi V pada perbedaan konsentrasi substrat [27].

Kecepatan reaksi (V) dengan V_{maks} , dapat dirumuskan pada persamaan 2.4 :

$$V = \frac{V_{maks} [S]}{K_M + [S]} \quad (2.4)$$

Bila diambil kebalikannya , maka rumus tersebut dapat dilihat pada persamaan 2.5 :

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M + [S]}{V_{maks} [S]} = \frac{[S]}{V_{maks} [S]} + \frac{K_M}{V_{maks} [S]} \quad (2.5)$$

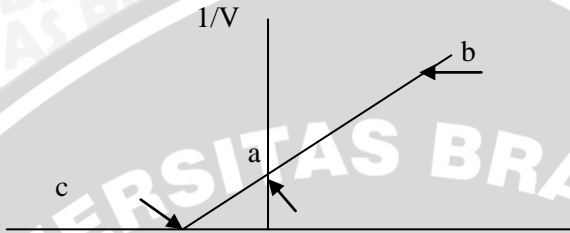
$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{maks}} + \frac{K_M}{V_{maks}} \frac{1}{[S]}$$

Bila $1/V = Y$ dan $1/[S] = X$, dapat ditulis persamaan 2.6 :

$$Y = ax + b$$

$$\frac{1}{V_{maks}} = b \quad \frac{K_M}{V_{maks}} = a \quad (2.6)$$

Bila kita plotkan $1/V$ sebagai ordinat dan $1/[S]$ sebagai absis akan diperoleh suatu garis lurus yang akan memotong ordinat pada $1/V_{\text{maks}}$ dan absis pada $1/-K_M$ dengan gradien (slope) = K_M / V_{maks} , hal ini dapat dilihat pada Gambar 2.8



Gambar 2.8 Kurva Lineweaver dan Burk untuk menentukan V_{maks} dan K_M

dimana :

a = perpotongan sumbu $-y = 1 / V_{\text{maks}}$

b = gradien = K_M / V_{maks}

c = perpotongan pada sumbu $-x = -1 / K_M$

Dengan demikian harga $1 / V_{\text{maks}}$ diketahui dan nilai V_{maks} didapat, demikian juga nilai $1 / K_M$ diketahui dan K_M dapat didapat juga. Harga K_M enzim sangat bervariasi pada umumnya berkisaran dari $10^{-1} - 10^{-6}$ M. Harga K_M suatu enzim tergantung pada jenis substrat dan juga keadaan lingkungan seperti suhu dan kekuatan ion [27].

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biokimia, dan Instrumen Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya Malang. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni sampai dengan bulan September 2013.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah organofosfat hirolase hasil isolasi dari bakteri *Pseudomonas putida*. Bahan kimia yang digunakan dengan kualitas *for microbiology* seperti *yeast extract*, nutrient agar, dan larutan BSA 22% (b/v). Bahan kimia yang digunakan memiliki kualitas pro analisis, antara lain organofosfat diazinon, organofosfat malathion, padatan NaOH, HCl 0,1M, H₂SO₄ 96%, padatan CuSO₄·5H₂O, asam asetat glacial, (NH₄)₂SO₄, K₂HPO₄, KH₂PO₄, padatan sukrosa, akuades, Na-K-Tartrat, FeSO₄·7H₂O, MgSO₄·4H₂O, Na₂MoO₄·2H₂O, ZnSO₄·7H₂O, tris amino metan.

3.2.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain seperangkat alat gelas, jarum ose, oven, aluminium foil, kapas steril, kantong selofan, kertas saring *Whatman* no.40, neraca analitik (Mettler Toledo AL 204), neraca analitik (Bosch PE 620), laminar air flow, inkubator (Heraeus Type B 5042), pH meter (Inolab WTW), penangas air (Memmert W 200), pemanas listrik (Janke-Kunkel), Spectronic Genesys 20 (Thermo Scientific Genesys 20), inkubator (merek Heraeus tipe B-5042), sentrifuge dingin Jouan (tipe MR 18-22), autoklaf (Model LS-C35L Electric Heater Vertical Sterilizer), shaker (merek Edmund tipe 25), pH meter (merek schoot-sgerate tipe CG.820), sentrifuse (Refrigerated sentrifuse (bio fuge primo) Thermoscientific 10000/putaran), neraca ohaus, kawat stainless steel 0,5 mm, pembakar spiritus, lemari es (smasung), magnetik stirer (merek Ikamag RH), dan spektrofotometer UV-Vis dan kuvet.

3.3 Tahapan Penelitian

1. Pembuatan media padat
2. Peremajaan biakan *Pseudomonas putida*
3. Pembuatan media cair
4. Pembuatan inokulum
5. Kurva pertumbuhan
6. Isolasi ekstrak kasar OPH
7. Pemurnian ekstrak kasar OPH
8. Uji kadar protein OPH
9. Penentuan aktivitas spesifik OPH
10. Karakterisasi OPH
11. Analisa data

3.4 Prosedur Kerja Penelitian

3.4.1 Pembuatan media padat

Media pertumbuhan bakteri yang digunakan adalah media padat agar miring untuk peremajaan *Pseudomonas putida*. Media pertumbuhan ini terdiri dari 5 g nutrient agar, dilarutkan dengan 100 mL akuades dan dipanaskan hingga mendidih selama 10 menit. Larutan selanjutnya dimasukkan ke dalam 10 tabung reaksi sebanyak 7 mL, kemudian mulut tabung ditutup kapas, tabung dilapisi dengan kertas coklat dan disterilkan dalam autoklaf pada temperatur 121°C, tekanan 15psi, selama 15 menit. Tabung kemudian diangkat dari autoklaf dan diletakkan pada posisi miring dan dibiarkan mengeras selama 24 jam [18].

3.4.2 Peremajaan biakan *Pseudomonas putida*

Biakan *Pseudomonas putida* diremajakan dalam media padat agar miring yang telah siap dengan cara membakar jarum ose hingga merah menyala dengan nyala api supaya steril, selanjutnya jarum ose diletakkan disekitar tabung dengan pelan – pelan sampai ose tidak terlalu panas. Menggoreskan jarum ose yang mengandung *Pseudomonas putida* setelah mulut tabung disterilkan pada nyala api. Tabung ditutup kembali dengan kapas steril dan diinkubasi pada temperatur ruang selama 48 jam dan disimpan dalam lemari es yang akan dihasilkan subkultur biakan murni [18].

3.4.3 Pembuatan media cair

Media pertumbuhan *Pseudomonas putida* untuk menghasilkan organofosfat hidrolase (OPH) dibuat dengan menimbang 11 g KH_2PO_4 , 28,5 g (K_2HPO_4) , 14 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dicampur semua komposisi dilarutkan dengan sedikit akuades dan dipanaskan selama 5 menit dipenangas air. Larutan diambil 80 mL ditambahkan 0,5 g *yeast extract* dan 10 mL larutan elemen renik, dilarutkan dengan sedikit akuades kemudian dimasukkan ke dalam gelas kimia dan dipindahkan ke dalam labu ukur 1000 mL. Larutan selanjutnya diambil 80 mL dengan gelas ukur 50 mL dan dipindahkan ke dalam erlenmeyer 250 mL kemudian ditambahkan 10 mL sukrosa 20% lalu mulut tabung ditutup kapas, tabung dilapisis kertas coklat dan disterilkan dalam autoklaf pada temperatur 121 °C, tekanan 15 psi, selama 15 menit. Tabung kemudian diangkat dari autoklaf dan dibiarkan dingin pada temperatur ruang lalu ditambahkan 10 mL organofosfat untuk 2 erlenmeyer berisi masing – masing organofosfat diazinon 40 ppm dan malathion 145 ppm. Media pertumbuhan ini dibuat sebanyak 80 erlenmeyer dengan komposisi yang sama.

3.4.4 Pembuatan biakan aktif (inokulum)

Bakteri yang telah tumbuh dalam media padat miring diambil sedikit dengan caradigores menggunakan jarum ose steril dan dimasukkan ke dalam media cair erlenmeyer 250 mL media cair. Media cair diinkubasi dengan shaker dengan kecepatan putar 125 rpm pada temperatur ruang selama 24 jam [18].

3.4.5 Pembuatan kurva pertumbuhan

Satu tabung subkultur bakteri hasil peremajaan ditambah akuades steril sebanyak 5 mL. Tabung subkultur bakteri tersebut kemudian digesek dengan jarum ose steril hingga semua bakteri pada media padat terlepas. Larutan yang mengandung bakteri dipipet 1 mL dengan pipet steril kemudian ditanam dalam 100 mL media pertumbuhan. Media cair tersebut diinkubasi pada shaker dengan kecepatan 125 rpm pada temperatur ruang selama 48 jam. Setiap selang waktu 1 jam diambil 1 mL dengan pipet steril dan diencerkan sampai volume 10 mL kemudian dilakukan pengukuran absorbansi pertumbuhan sel pada panjang gelombang 450 nm menggunakan spektrometri-20 dengan filter merah. Grafik hubungan waktu inkubasi

dengan absorbansi dapat dibuat dan diperoleh kurva pertumbuhan *Pseudomonas putida*.

3.4.6 Isolasi ekstrak kasar OPH

Isolasi ekstrak kasar diawali dengan memproduksi enzim OPH. Enzim OPH diproduksi dengan memindahkan biakan aktif *Pseudomonas putida* ke dalam media cair dan diinkubasi pada inkubatur goyang (*shaker*) selama fasa pertumbuhan bakteri. Biakan aktif (inokulum) dimasukkan ke dalam 16 buah media pertumbuhan cair masing-masing sebanyak 10 mL, kemudian dishaker selama 2 hari dengan kecepatan 125 rpm. Selanjutnya larutan dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit. Dibuang supernatan yang diperoleh kemudian diambil endapannya. Endapan sel yang diperoleh ditambahkan dengan serbuk kaca kemudian ditumbuk menggunakan mortar alu. Disimpan hasil endapan sel yang telah diperoleh. Ditambahkan buffer tris-asetat 0,1 M pH 7,5 secukupnya untuk seluruh endapan yang diperoleh, kemudian disentrifugasi dingin dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit. Dibuang endapan yang diperoleh dan supernatan yang diperoleh disimpan di lemari es. Supernatan ini merupakan enzim kasar organofosfat hidrolase.

3.4.7 Pemurnian ekstrak kasar OPH

Ekstrak kasar OPH dimurnikan menggunakan amonium sulfat dengan pengendapan fraksi 0–45% dan 45–65%. Terlebih dahulu dibuat untuk fraksi pengendapan 0–45% yaitu diambil supernatan yang merupakan enzim kasar OPH sebanyak 30 mL ditambahkan 13,85 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Selanjutnya disentrifugasi pada 8500 rpm, temperatur 4°C selama 30 menit. Endapan yang diperoleh diambil dan supernatan digunakan untuk fraksi 45–65%. Supernatan yang diperoleh ditambahkan 4,02 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dicampurkan dalam 30 mL larutan ekstrak kasar OPH dan perlakuan sama seperti fraksi 0–45% disentrifugasi pada 8500 rpm, temperatur 4 °C selama 30 menit. Endapan yang diperoleh diambil dan supernatan disimpan.

Endapan yang terbentuk pada fraksi 0–45% dilakukan dialisis yaitu dengan menambahkan 4 mL buffer tris asetat 0,1 M pH 7,5 dan pada fraksi 45–65% ditambahkan 2 mL buffer tris asetat 0,1 M pH 7,5 dan dimasukkan dalam membran selofan. Kemudian direndam

dalam 100 mL buffer tris asetat 0,05 M pH 7,5 pada 0-45% dan 0,02 M pH7,5 pada 45-65% dalam gelas kimia 250 mL sambil diaduk menggunakan pengaduk pada temperatur rendah 4°C. Dialisis dilakukan selama 24 jam di dalam *cool box*. Kemudian larutan buffer perendam diganti dengan buffer perendam yang baru sampai semua garam terpisah. Untuk mengetahui bahwa dialisis sudah selesai, diuji dengan mengambil 5 mL buffer perendam dan dimasukkan dalam tabung reaksi ditambah 1 mL larutan HCl 0,1 M dan ditambah lima tetes larutan BaCl₂ 0,1 M. Apabila tidak ada endapan, dialisis dihentikan.

3.4.8 Pembuatan kurva baku BSA

BSA dipipet sebanyak 4,5 mL dilarutkan dengan 50 mL akuades dalam gelas kimia 250 mL. Larutan NaOH 0,1 N kemudian ditambahkan beberapa tetes, selanjutnya dimasukkan dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas serta dikocok hingga homogen dan diperoleh larutan stok BSA 10000 ppm. Dipipet masing-masing (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9) mL lalu dimasukkan labu ukur 10 mL yang berbeda. Ditambahkan akuades sampai tanda batas sehingga diperoleh BSA (1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000) ppm. Tiap konsentrasi BSA diambil 2 mL, dimasukkan pada tabung reaksi berbeda, lalu ditambah 8 mL reagen Biuret dan 2 mL buffer tris asetat pH 7,5 lalu dikocok dan diinkubasi pada temperatur 50°C selama 30 menit. Sebelum mengukur absorbansi larutan standar, ditentukan terlebih dahulu panjang gelombang maksimumnya pada konsentrasi 5000 ppm. Larutan standar diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum BSA yaitu 540 nm. Hasil pengukuran absorbansi larutan standar pada berbagai konsentrasi dibuat persamaan regresi linear sehingga dihasilkan kurva baku BSA [18].

3.4.9 Uji kadar protein

Penentuan kadar protein dilakukan menggunakan reagen Biuret. Sebanyak 2 mL larutan enzim 45% dan 65% ditambah 8 mL reagen Biuret dan 2 mL larutan BSA 5000 ppm, kemudian dikocok dan didiamkan selama 30 menit pada temperatur 50°C. Selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum BSA yaitu 540 nm sehingga kadar protein diketahui dengan memplotkan

nilai absorbansi pada persamaan regresi kurva standar BSA. Sebagai blanko dipipet 2 mL akuades, 8 mL reagen Biuret dan 2 mL buffer tris asetat pH 7,5 selanjutnya diperlakukan sama seperti perlakuan sebelumnya [18].

3.4.10 Penentuan aktivitas spesifik OPH

Penentuan aktivitas spesifik enzim dilakukan setelah pemurnian dan dialisis pada enzim OPH. Aktivitas spesifik dapat diperoleh setelah menghitung aktivitas enzim dan kadar proteinnya, dinyatakan dalam satuan U/ mg. Penentuan dilakukan dengan cara mengukur jumlah senyawa pereduksi yang dihasilkan dari reaksi hidrolisis substrat organofosfat. Enzim yang telah dimurnikan ditentukan aktivitas spesifiknya dengan cara, diambil 2 mL masing-masing substrat diazinon dan malathion yang telah dilarutkan dengan buffer tris asetat pH (7,5; 8; 8,5; 9; 9,5). Ditambahkan 0,1 mL enzim hasil pemurniaan bertingkat fraksi 45% serta 65%. Diinkubasi selama 30 menit, kemudian diukur absorbansi pada panjang gelombang maksimum substrat diazinon 247 nm dan malathion 221 nm.

Pengukuran aktivitas enzim, dilakukan dengan mengkonversikan nilai absorbansi yang diperoleh pada persamaan kurva standar sehingga dapat diketahui berapa konsentrasi substrat diazinon dan malathion yang diperoleh dari hasil hidrolisis organofosfat yang dikatalis dengan enzim OPH. Untuk melihat besarnya satu unit aktifitas enzim tersebut digunakan rumus pada persamaan 3.1 [27]:

$$AE = \frac{[P]xV}{Mr\ pestisida} \times \frac{fp}{p \times q} \tag{3.1}$$

dimana :

- AE = aktifitas enzim ($\mu\text{mol} \cdot \text{menit}^{-1}$)
- [P] = konsentrasi produk ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)
- V = volume total sampel percobaan pada tiap tabung (mL)
- q = waktu reaksi (menit)
- p = volume ekstrak kasar OPH (mL)
- fp = faktor pengenceran

Aktivitas masing-masing enzim yang telah dimurnikan kemudian di bagi dengan jumlah kadar protein masing-masing fraksi pada

pengendapan amonium sulfat 0-45% dan 45-65%. Aktivitas spesifik enzim dapat dinyatakan dalam persamaan 3.2 [27] :

$$\text{Aktifitas Spesifik (U / mg)} = \frac{\text{Aktivitas Enzim OPH (Unit)}}{\text{Kadar protein (mg)}} \quad (3.2)$$

3.4.11 Karakterisasi enzim OPH

Karakterisasi Organofosfat hidrolase diuji aktivitas spesifiknya pada variasi pH (7,5; 8; 8,5; 9; 9,5), temperatur ruang, waktu inkubasi 30 menit, dan variasi konsentrasi substrat diazinon (0; 6; 8; 10; 15; 20) ppm dan substrat malathion (0; 10; 15; 20; 25; 30) ppm serta dihitung nilai V_{maks} dan K_M .

Tahapan karakterisasi variasi konsentrasi enzim dilakukan untuk menentukan pH optimum dan parameter kinetik V_{maks} dan K_M , dengan cara sebagai berikut, dilakukan penambahan 2 mL substrat dengan masing - masing konsentrasi yang berbeda untuk diazinon dan malathion yang telah larut dengan buffer tris asetat dengan variasi pH (7,5; 8; 8,5; 9; 9,5). Substrat dengan variasi pH dan konsentrasi dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan enzim kasar OPH fraksi pengendapan 0-45% dan 45-65% masing – masing 0,1 mL. Selanjutnya diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang masing – masing substrat diazinon 247 nm dan malathion 221 nm.

Penentuan nilai V_{maks} dan K_M dapat dihitung melalui persamaan $y = ax + b$ pada kurva terhadap kecepatan enzim (V) dan konsentrasi substrat [S]. Dengan demikian harga $1 / V_{maks}$ diketahui dan nilai V_{maks} didapat, demikian juga nilai $1 / K_M$ diketahui dan K_M dapat didapat juga.

3.5 Analisis Data

Data hasil perlakuan penentuan aktivitas spesifik, pH optimum dan nilai V_{maks} dan K_M dianalisis dengan uji F menggunakan Rancangan acak Lengkap (RAL) dan (RAK). Bila terdapat perbedaan nyata maka dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT 1%).

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

Tahapan yang dilakukan pada penelitian ini meliputi penyiapan media (padat dan cair), peremajaan kultur murni *Pseudomonas putida*, pembuatan kurva pertumbuhan *Pseudomonas putida*, produksi isolasi enzim OPH, pemurnian OPH dengan fraksinasi bertingkat amonium sulfat, penentuan kadar protein dan aktivitas spesifik OPH, penentuan kondisi optimum pH, serta penentuan parameter kinetik (K_M dan V_{maks}).

4.1 Media Produksi dan Peremajaan Kultur Murni *Pseudomonas putida*

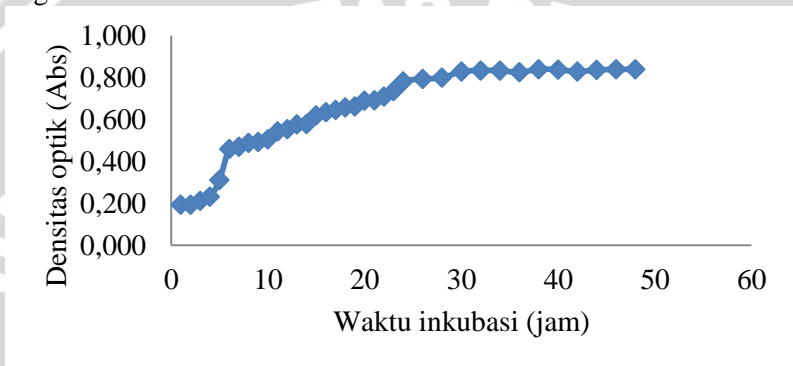
Media pertumbuhan mengandung nutrisi dan zat – zat yang diperlukan oleh bakteri *Pseudomonas putida* untuk tumbuh. Media padat digunakan untuk peremajaan kultur murni *Pseudomonas putida* sedangkan media cair digunakan untuk produksi dan isolasi enzim. Peremajaan dilakukan untuk menjaga ketersediaan nutrisi, bakteri aktif dan menghindari terjadinya perubahan karakter dari kultur murni *Pseudomonas putida*.

4.2 Pembuatan Kurva Pertumbuhan

Kurva pertumbuhan menggambarkan fase – fase yang ada dalam siklus hidup *Pseudomonas putida* yang meliputi fase adaptasi, fase logaritmik, fase stasioner dan fase kematian. Berdasarkan kurva pertumbuhan dapat ditentukan waktu panen yang tepat sehingga diperoleh enzim organofosfat hidrolase yang maksimal. Waktu panen yang ideal adalah pada saat pertumbuhan bakteri mendekati fase stasioner. Pada saat ini, jumlah sel bakteri mendekati maksimum enzim OPH yang didapat dan tidak mengalami kerusakan seiring kematian bakteri.

Pembuatan kurva pertumbuhan diawali dengan penumbuhan kultur *Pseudomonas putida* yang telah diremajakan dalam media cair dan diinkubasi pada *shaker* pada suhu kamar dengan kecepatan putar 125 rpm. Penggunaan *shaker* bertujuan untuk mengatur aerasi dan agitasi yang menjaga kondisi fisika dan kimia media pertumbuhan serta memperlancar transfer nutrisi kedalam sel.

Pertumbuhan *Pseudomonas putida* diamati dengan mengukur densitas optik (OD) media pertumbuhan pada panjang gelombang 450 nm, setiap selang waktu 1 jam sampai nilai OD media konstan dan akhirnya mengalami penurunan. Nilai OD sebanding dengan massa sel yang terdapat dalam media, makin banyak sel maka makin besar nilai OD. Kemudian kurva pertumbuhan dibuat dengan membuat grafik hubungan antara OD dengan waktu inkubasi.



Gambar 4.1 Kurva pertumbuhan *Pseudomonas putida*

Dari Gambar 4.1 diketahui bahwa pertumbuhan *Pseudomonas putida* melewati fase adaptasi, fase logaritmik, fase stasioner dan fase kematian. Fase adaptasi terjadi pada waktu inkubasi 0-4 jam, pada fase ini bakteri melakukan adaptasi dengan lingkungannya atau media sehingga terjadi sangat lambat. Fase logaritmik pada waktu inkubasi 4-34 jam, pada waktu ini sel mengalami pembelahan dan terjadi secara terus menerus sehingga sel mengalami peningkatan sampai maksimum. Awal fase stasioner dicapai pada waktu inkubasi 34 jam, pada fase ini pembelahan sel dan jumlah sel yang mati sama, jadi tidak terjadi peningkatan. Fase kematian terjadi setelah diinkubasi selama 48 jam, pada fase ini jumlah sel menurun dikarenakan nutrisi dalam media habis.

4.3 Produksi dan Isolasi Enzim OPH

Produksi enzim OPH diawali dengan pembuatan inokulum (biakan aktif) *Pseudomonas putida*. Pembuatan inokulum dilakukan untuk memperpendek fase adaptasi dari *Pseudomonas putida*. Inokulum dibuat dengan menumbuhkan biakan murni selama

setengah fase logaritmik sehingga diperoleh biakan yang memiliki kemampuan beradaptasi dengan media yang baik dan kecepatan pembelahan maksimum.

Enzim OPH diproduksi dengan memindahkan biakan aktif *Pseudomonas putida* ke dalam media cair dan diinkubasi pada pada inkubatur goyang (*shaker*) selama 34 jam. Sel bakteri yang mengandung enzim OPH dipisahkan dengan sentrifugasi dingin. Enzim OPH yang merupakan enzim intraseluler diperoleh dengan memecah sel bakteri yang telah dibekukan selama 34 jam dengan bantuan serbuk kaca sebagai molekul abrasif. Proses pemisahan dan pemecahan sel bakteri dilakukan menggunakan sentrifugasi dingin dengan kecepatan 3000 rpm pada suhu dingin 4°C karena enzim merupakan protein yang mudah mengalami denaturasi oleh panas. Pada proses pemecahan sel ditambahkan buffer tris asetat pH 7,5 untuk mempertahankan pH sehingga enzim yang diperoleh tidak mengalami denaturasi oleh pH yang terlalu tinggi atau rendah. Enzim OPH masih berupa ekstrak kasar dipisahkan dari sisa sel bakteri dengan sentrifugasi dingin. Dari 800 mL media pertumbuhan diperoleh 400 mL ekstrak kasar enzim.

4.4 Pemurnian Enzim OPH

Enzim OPH yang diperoleh dari hasil isolasi masih berupa ekstrak kasar. Larutan ekstrak kasar enzim selanjutnya dimurnikan secara bertingkat dengan cara menambahkan garam amonium sulfat. Garam amonium sulfat yang ditambahkan yaitu dengan fraksi pengendapan bertingkat 0-45% dan 45-65%. Ion – ion garam amonium sulfat yang ditambahkan menarik molekul air yang mensolvasi protein enzim, karena memiliki kelarutan yang lebih tinggi dari pada protein, sehingga antar protein akan saling berinteraksi membentuk gumpalan dan mengendap. Protein yang berukuran besar (berat molekul besar) akan mengendap lebih dahulu dibanding protein yang berukuran kecil (berat molekul kecil) karena gaya gravitasi. Fraksi pengendapan bertingkat menggunakan garam amonium sulfat bertujuan untuk mengetahui tingkat kemurnian enzim yang lebih baik. Jumlah garam amonium sulfat yang ditambahkan, berdasarkan persen fraksi pengendapan dengan menggunakan tabel kelarutan amonium sulfat. Hasil pengendapan

berupa fraksi – fraksi endapan yang masih tercampur dengan sisa garam amonium sulfat.

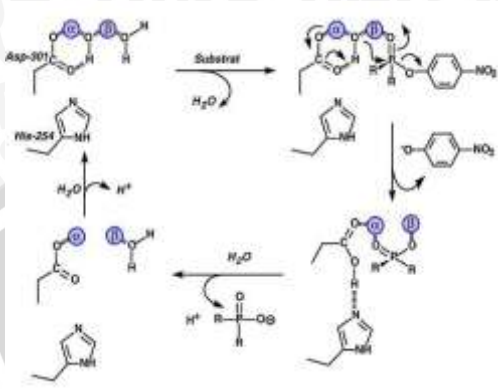
Untuk memisahkan garam amonium sulfat dari endapan protein dilakukan dialisis menggunakan kantong selofan. Pemisahan terjadi karena adanya efek difusi akibat perbedaan konsentrasi pada sisi dalam dan luar membran. Ion amonium sulfat yang memiliki ukuran lebih kecil terdifusi keluar membran, sedangkan molekul protein yang berukuran besar tetap berada dalam membran. Dengan mengganti larutan yang ada di luar membran dengan ion - ion amonium sulfat yang ada dalam kantong selofan berkurang sampai dalam jumlah yang sangat kecil, ditandai dengan tidak adanya lagi ion amonium sulfat yang terdifusi keluar. Untuk mengujinya, dilakukan penambahan 5 tetes BaCl_2 0,1 M ke dalam 5 mL cuplikan larutan yang ada di luar membran yang telah ditambahkan pula dengan 1 mL HCl. Ion SO_4^{2-} menyebabkan terbentuknya endapan putih (BaSO_4). Selanjutnya masing – masing enzim hasil dialisis diuji aktivitasnya, diukur kadar proteinnya dan dihitung aktivitas spesifiknya.

4.5 Penentuan Kadar Protein dan Aktivitas Spesifik Enzim OPH

Kadar protein enzim OPH ditentukan dengan metode Biuret. Metode ini didasarkan pada pengukuran serapan kompleks berwarna ungu yang terbentuk antara ikatan peptida dalam protein dengan reagen Biuret. Kompleks ini terbentuk apabila empat atom nitrogen dari asam amino berikatan dengan Cu^{2+} dari CuSO_4 .

Enzim OPH dalam mendegradasi organofosfat diazinon dan malathion dapat diketahui melalui aktivitas spesifik enzimnya. Dalam hal ini, enzim OPH hasil isolasi dari *Pseudomonas putida* mengkatalisis reaksi hidrolisis dari organofosfat diazinon dan malathion.

Mekanisme hidrolisis organofosfat dengan bantuan OPH mengikuti mekanisme SN_2 dengan adanya inversi pada atom fosfor. Gugus yang bertindak sebagai nukleofil adalah gugus hidroksil teraktivasi, dapat dilihat pada Gambar 4.2. Gugus ini menyerang atom fosfor sehingga terjadi pemutusan ikatan fosfoester dan pelepasan gugus pergi [35] .



Gambar 4.2 Mekanisme reaksi hidrolisis organofosfat dengan bantuan OPH

Kadar protein ditentukan dengan menginterpolasikan serapan sampel pada kurva baku BSA $Y = 3.10^{-5} X + 0,023$. Kadar protein yang diperoleh untuk fraksi pengendapan 0-45% adalah 1,355 mg dan fraksi 45-65% adalah 4,177 mg. Apabila kadar protein larutan enzim sudah diketahui maka dapat ditentukan aktivitas spesifiknya. Aktivitas spesifik OPH dengan substrat diazinon dan malathion pada tiap fraksi pengendapan amonium sulfat dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Aktivitas spesifik enzim OPH pada fraksi pengendapan ammonium sulfat 0-65% menggunakan substrat diazinon dan malathion

Fraksi	Substrat	Aktivitas Spesifik (unit/ mg)
0-45%	Diazinon	0,035
45 - 65%	Diazinon	0,009
0 - 45%	Malathion	0,067
45 - 65%	Malathion	0,016

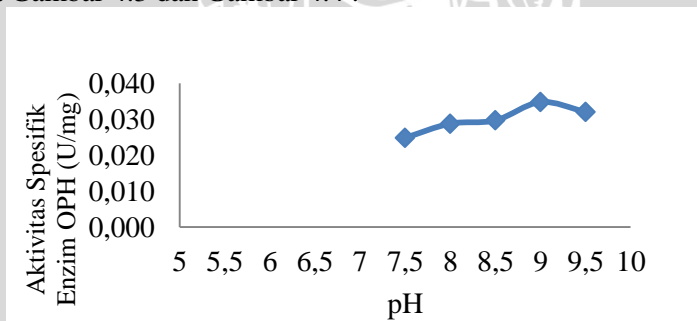
Berdasarkan Tabel 4.1 diketahui bahwa aktivitas spesifik enzim OPH paling besar terdapat pada fraksi pengendapan 0-45% untuk substrat diazinon dan malathion. Hal ini menunjukkan bahwa pada fraksi dan substrat tersebut sebagian besar protein yang terendapkan merupakan protein enzim OPH yang dibuktikan dengan meningkatnya aktivitas spesifik. Dari Tabel 4.1 juga dapat dilihat

bahwa protein spesifik OPH mempunyai berat molekul sedang (mengendap pada fraksi pengendapan 0-45%).

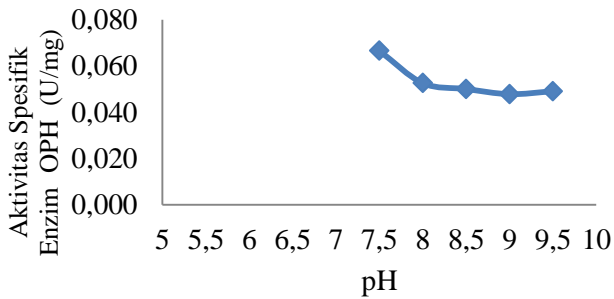
4.6 Penentuan pH optimum dengan variasi konsentrasi substrat

pH optimum merupakan pH dimana enzim memiliki aktivitas paling tinggi. pH optimum setiap enzim berbeda – beda, tergantung sisi aktif enzim tersebut. Pada pH optimum muatan sisi aktif enzim sesuai dengan substrat sehingga interaksi yang terjadi optimal. Pada pH yang kurang atau lebih dari pH optimum maka aktivitas enzim menurun. Hal ini disebabkan sisi aktif enzim tersebut kurang sesuai dengan substrat. Bahkan pada pH yang ekstrim (terlalu asam atau basa) enzim tidak menempatkan aktivitas sama sekali. Hal ini terjadi karena enzim memiliki sifat protein yang terdenaturasi oleh pH yang ekstrim. Konsentrasi substrat digunakan untuk mengetahui konsentrasi terbaik substrat yang berikatan atau bereaksi dengan enzim OPH. Konsentrasi substrat dibuat dengan variasi (6; 8; 10; 15; 20) ppm untuk diazinon dan malathion (10; 15; 2; 25; 30) ppm pada pH (7,5; 8; 8,5; 9; 9,5).

Aktivitas spesifik terbesar enzim OPH dengan menggunakan fraksi pengendapan bertingkat amonium sulfat 0-45% dan 45-65% pada substrat diazinon dan malathion, terdapat pada fraksi pengendapan 0-45%. Oleh karena itu untuk menentukan pH optimumnya maka dilakukan pada fraksi pengendapan 0-45%. Pengaruh pH terhadap aktivitas spesifik enzim OPH dapat dilihat pada Gambar 4.3 dan Gambar 4.4 :



Gambar 4.3 Aktivitas spesifik enzim OPH menggunakan substrat diazinon fraksi pengendapan 0-45% pada variasi pH (7,5; 8; 8,5; 9; 9,5)



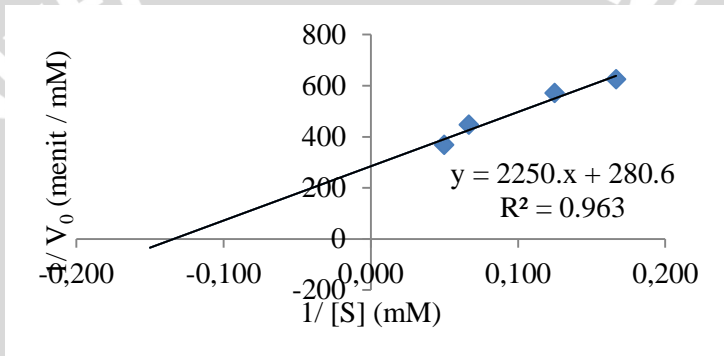
Gambar 4.4 Aktivitas spesifik enzim OPH menggunakan substrat malathion dengan fraksi pengendapan 0-45% pada variasi pH (7,5; 8; 8,5; 9; 9,5)

Berdasarkan Gambar 4.3 dan Gambar 4.4 menunjukkan bahwa aktivitas spesifik tertinggi diazinon sebesar 0,035 unit/mg pada pH 9 dan malathion sebesar 0,067 unit/mg pada pH 7,5. Aktivitas spesifik enzim OPH untuk substrat diazinon dan malathion berbeda, karena kemampuan enzim dalam mendegradasi masing – masing substrat berbeda, sesuai dengan struktur substratnya. Malathion memiliki aktivitas yang lebih besar dibandingkan diazinon, itu berarti sisi aktif enzim lebih mudah mendegradasi malathion. Aktivitas yang berbeda ini berpengaruh terhadap penentuan pH optimum. pH optimum ini sisi aktif enzim OPH sesuai dengan masing – masing substratnya. Terjadi perbedaan pH optimum pada masing-masing substrat dikarenakan adanya perbedaan kemampuan atau kecepatan masing – masing substrat saat berikatan dengan enzim. Perubahan pH dapat menyebabkan perubahan status ionisasi muatan asam amino yang berperan penting dalam pengikatan substrat atau aktivitas katalitiknya.

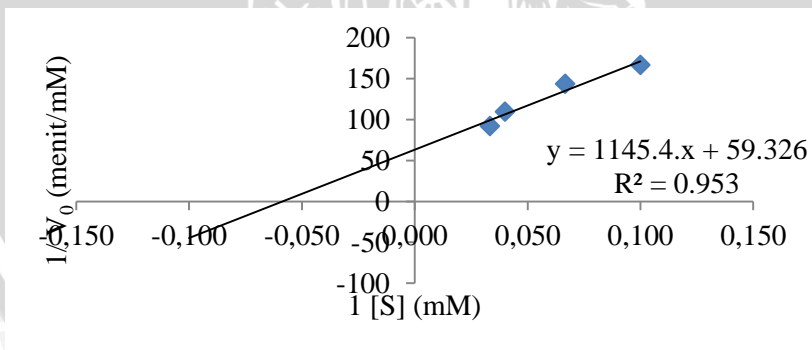
4.7 Penentuan K_M dan V_{maks}

Penentuan K_M dan V_{maks} diperlukan untuk mengetahui karakteristik suatu enzim. Nilai K_M dan V_{maks} menggambarkan kemampuan dan kecepatan enzim terhadap substrat. K_M menunjukkan konsentrasi substrat yang menyebabkan kecepatan reaksi enzimatik mencapai setengah maksimum. Sedangkan nilai V_{maks} merupakan kecepatan reaksi pada saat enzim telah jenuh dengan substrat. Pada keadaan ini kecepatan reaksi tidak dapat

ditingkatkan lagi meskipun konsentrasi substrat ditingkatkan. Penentuan K_M dan V_{maks} OPH dilakukan dengan dengan variasi konsentrasi substrat diazinon (6; 8;15; 20) ppm dan malathion (10; 15; 25; 30) ppm, pada pH optimumnya masing – masing dengan temperatur ruang dan waktu inkubasi 30 menit. Nilai K_M dan V_{maks} sulit ditentukan dengan menggunakan persamaan Michaelis-Menten. Hal ini dapat dipermudah dengan menggunakan penyederhanaan Lineweaver dan Burk, dimana K_M dan V_{maks} ditentukan dengan membuat persamaan garis lurus hubungan antara $1/[S]$ dan $1/V$ (Gambar 4.5 dan Gambar 4.6).



Gambar 4.5 Hubungan antara $1/[S]$ dengan $1/[V]$ untuk substrat diazinon



Gambar 4.6 Hubungan antara $1/[S]$ dengan $1/[V]$ untuk substrat malathion

Berdasarkan hasil perhitungan dari grafik hubungan antara $1/[S]$ dengan $1/[V]$ menunjukkan nilai V_{maks} dan K_M untuk substrat diazinon adalah sebesar $0,0035\mu\text{mol}/\text{menit}$ dan $7,8\text{ mg/L}$, sedangkan untuk substrat malathion diperoleh nilai V_{maks} dan K_M sebesar $0,0168\mu\text{mol}/\text{menit}$ dan $19,24\text{ mg/L}$. Diazinon dan malathion memiliki nilai V_{maks} dan K_M yang berbeda ini dikarena konsentrasi untuk masing – masing substrat berbeda. Perbedaan Nilai K_M menunjukkan konsentrasi sisa substrat pada saat kecepatan reaksi enzimatik setengah maksimum. Malathion memiliki nilai V_{maks} dan K_M yang lebih tinggi dibandingkan diazinon, itu berarti kecepatan reaksi pada saat enzim OPH telah jenuh dengan substrat malathion lebih cepat tercapai sehingga K_M yang menunjukkan kecepatan reaksi enzimatik telah mencapai setengah maksimum.



BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa :

1. Enzim organofosfat hidrolase dapat mendegradasi organofosfat diazinon menjadi 2-isopropil-6-pirimidin-4-il dan O,O-dietil fosforoditioat, aktivitas spesifiknya pada fraksi pengendapan 0-45% sebesar 0,035 unit, sedangkan organofosfat malathion menjadi O,O-dimetilfosforoditioat dan dietil maleat dengan aktivitas spesifik 0,067 unit.
2. Pengukuran Aktivitas spesifik tertinggi enzim organofosfat hidrolase dengan substrat diazinon, terdapat pada pH 9 dengan nilai V_{maks} dan K_M adalah 0,0035 $\mu\text{mol}/\text{menit}$ dan 7,8 mg/L, dan substrat malathion pada pH 7,5 dengan nilai V_{maks} dan K_M adalah 0,0168 $\mu\text{mol}/\text{menit}$ dan 19,24 mg/L.

5.2 Saran

Pada penelitian ini sebaiknya aktivitas enzim tidak hanya dipelajari melalui pengaruh pH dan konsentrasi substratnya. Selain itu, juga perlu dilakukan penelitian terhadap parameter lain, misalnya temperatur dan waktu inkubasi. Aktivitas untuk masing – masing substrat sebaiknya dilakukan uji lebih lanjut untuk mengetahui enzim OPH yang dihasilkan.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Poedjiadi, A. dan Supriyanti F. M. T., 2006, **Dasar-Dasar Biokimia**, UI-Press, Jakarta.
- [2] Murni, S. W., Kholisoh S. D., D. L. Tanti dan E. M. Petriusia, 2011, **Produksi, Karakterisasi, dan Isolasi Lipase dari *Aspergillus niger***, *Prosiding Seminar Nasional Tkenik Kimia "Kejuangan"*, Yogyakarta, 22 Februari 2011.
- [3] Ningfeng, W., Minjie, D., Xiuyun, S., Guoyi1, L., Bin Y., dan Yunliu, F., 2004, **Isolation, purification and characterization of a new organophosphorus hydrolase OPHC2**, *Chinese Science Bulletin*, Vol. 49 (3) : 268 - 272.
- [4] Shahbaz, Hamid M., 2012, **Isolation, purification, and Characterization of Proline Dehydrogenase from a *Pseudomonas putida* POS-F84 Isolate**, *Iranian Journal of Biotechnology*, Vol.10(2) :111 – 119
- [5] Tadeo, Jose L., Consuelo Sanchez-Brunete, dan LorenaGonzales, 2008, **Analysis of Pesticides in Food and Environmental Samples**, CRC Press, New York.
- [6] Environmental Protection Agency (EPA). **Method 1699: Pesticides In Water, Soil, Sediment, Biosolids, And Tissue By HRGC/HRMS**.EPA-821-R-08-001 December 2007.
- [7] Sismindari, 2006, **Analisis Residu Pestisida Organofosfat Diazinon, Profenofos, dan Ethion dalam Kubis secara Kromatografi Gas**, *artikel*, Badan Standarisasi Nasional, Jakarta.
- [8] Azis, Thamrin, 2012, **Desain dan Karakterisasi Biosensor Berbasis Immobilisasi Enzim Untuk Analisis Residu Pestisida Diazinon Dalam Tanaman Kubis (*Brassica oleraceae*)**, *Paradigma*, Jurnal, Vol. 16 (1) : 57-66.

- [9] Gahlaut, Anjum, Ashih Gothwal, Anil K. Chhillar, Vikas Hooda, 2012, **Electrochemical Biosensor for Determination of Organophosphorus Compounds : Review**, *Applied Biosensor*, Vol. 1 : 1-8.
- [10] Wirahadikusumah, M., 2008, **Biokimia, Protein, Enzim & Asam Nukleat**, Penerbit ITB, Bandung.
- [11] Fasya, 2005, **Isolasi, Pemurnian, dan Karakterisasi Enzim Dehalogenase 4 klorofenol dari Pseudomonas putida**, *Skripsi*, Jurusan Kimia Fakultas Mipa Universitas Brawijaya, Malang.
- [12] Environmental Protection Agency (EPA). **Method 1699: Pesticides In Water, Soil, Sediment, Biosolids, And Tissue By HRGC/HRMS**. EPA-821-R-08-001 December 2007.
- [13] Djalal, Salahudin, 1998, **Dilema Pestisida Tragedi revolusi hijau**, Penerbit Kanisius, Yogyakarta.
- [14] Paliwal, S, 2008, **Development of Enzyme Based Biosensor for the Detection of Organophosphate Neurotoxins**, *Disertasi*, Materials engineering, Auburn University, Auburn.
- [15] Indrajid, 2012, **Pengaruh Konsentrasi Glutaraldehida yang Ditambahkan pada Membran Kitosan Terhadap Kinerja Biosensor Konduktometri Diazinon**, *Skripsi*, Jurusan Kimia Fakultas Mipa Universitas Brawijaya, Malang.
- [16] Wyer, M., 2008, **Metal Ion Promoted Hydrolysis of the Organophosphorus Pesticide, Diazinon**, *Thesis*, Departement of Chemistry, Queen's University, Ontario.

- [17] NRA, 2002, **The NRA Review of Diazinon**, *National Registration Authority For Agricultural and Veterinary Chemicals*, Australia, Canberra.
- [18] Hamzah, Razak Achmad , 2009, **Tracer Pathway dari Insktisida Malathion dan Pengaruhnya Terhadap Organ Hati dan Otak Tikus**, *Makara, Kesehatan*, Vol. 13 (2) : 69-73.
- [19] Wuryanti, 2004, **Isolasi dan Penentuan Aktivitas Spesifik Enzim Bromelin dari Buah Nanas**, *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*, Vol. 7(3) :83-87.
- [20] Cremlyn, R.J., 1991, **Agrochemicals Preparation And Mode Action**. John Wiew and Sons, England.
- [21] Judoamidjojo, R. M., Darwis A. A., dan Sa'id E. G., 1992, **Teknologi Fermentasi**, Rajawali Press, Jakarta.
- [22] Saepudin, E. dan Setiasih S., 2007, **Kuliah Bioteknologi**, http://staff.ui.ac.id/internal/131599293/material/HandoutKuliahBioteknologiE_Saepudin.pdf, diakses tanggal 18 Januari 2014.
- [23] Sawhney, S.K. dan Singh R., 2008, **Introductory Practical Biochemistry**, Second Ed, Narosa Publishing House, New Delhi.
- [24] Farrel, S.O. dan Taylor L. E., 2006, **Experiments in Biochemistry a Hands-on Approach**, 2nd Edition, Thomsom Brooks/Cole, A part of The Thomson Corporation, New York.
- [25] Campbell, W.H., 2001, **Dialysis of Protein**, [http:// www. bio. mtu. Edu / campbell / b14820 /lectures/lec5/482w52.htm](http://www.bio.mtu.edu/campbell/b14820/lectures/lec5/482w52.htm), diakses pada tanggal 8 Januari 2014.

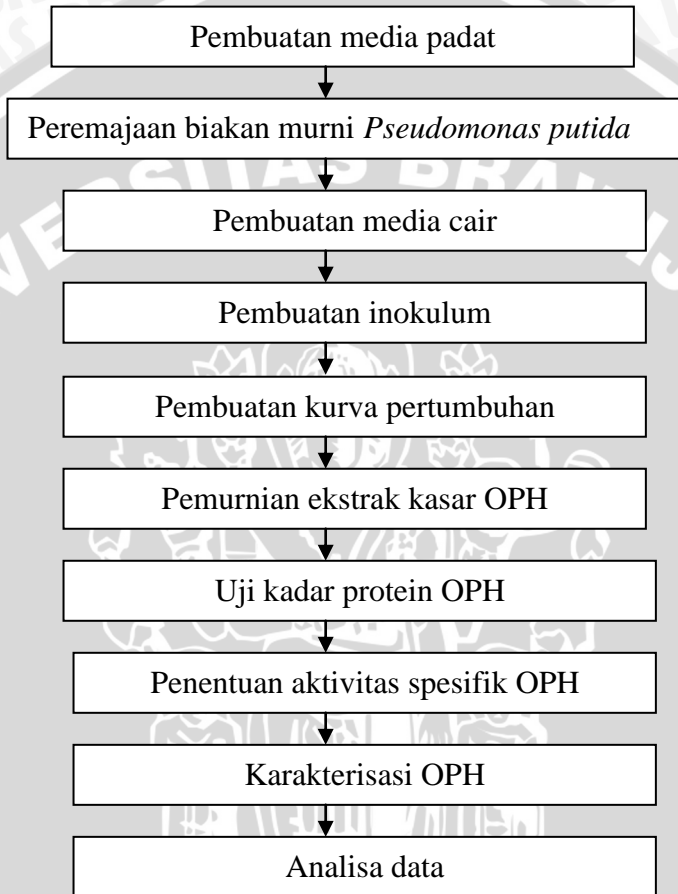
- [26] Espinosa-Urgel, M., Salido, A., Ramos, J, 2010, **Genetic Analysis of Functions Involved in Adhesion of *Pseudomonas putida* to Seeds**”.Journal of Bacteriology. May 2010. Vol.182 :2363-2369.
- [27] Winarno, F.G, 2010, **Enzim Pangan Edisi Revisi**,PT Gramedia, Bogor.
- [28] Ninfa, A. J., Ballou D. P. dan Benore M., 2009, **Fundamental Laboratory Approaches for Biochemistry and Biotechnology**, 2th Edition, John Willey & Sons, Inc., Michigan.
- [29] Shimazu, Mark, Anne Nguyen, Ashok Mulchandani, dan Wilfred Chen, 2003, **Cell Surface Display of Organophosphorus Hydrolase in *Pseudomonas putida* Using an Ice-Nucleation Protein Anchor**, *Biotechnol.prog*, Vol. 19 : 1612-1614.
- [30] Najavand S., 2012,**A High Potential Organophosphorus Pesticide-Degrading Enzyme From A Newly Characterized, *Pseudomonas aeruginosa* NL01**, *AfricanJournal of Microbiology Research*, Vol. 6 (20) : 4261-4269.
- [31] Simonian, A.L., B.D.Disioudi, dan J.R Wild, 1999, **An Enzyme Based Biosensor For The Direct Determination of Diisopropyl Fluorophosphate**, *Analytica Chimica*, 389: 189-196.
- [32] Mee Hie Cho, Chaterine, Ashok Mulchandani, dan Wilfred Chen, 2006, **Functional Analysis of Organophosphorus Hydrolase Variants with High Degradation Activity Towards Organophosphate Pesticides**, *Protein Engineering, Design and Selection*, Vol.19 (3) : 99-105.

- [33] Eggins, B., 2002, **Chemical Sensors and Biosensors**, John Wiley & Sons, Chichester.
- [34] Atkins, P dan J.D. Paula, 2006, **Physical Chemistry**, Oxford University Press ,Oxford.
- [35] Aubert, S. D., Li, Y., and Raushel, F. M, 2004, **Mechanism for the Hydrolysis of Organophosphates by the Bacterial Phosphotriesterase**, *Biochemistry*, Vol.43 : 5707-5715.



LAMPIRAN

Lampiran A. Tahapan penelitian



Lampiran B. Preparasi larutan

B.1 Pembuatan larutan konsentrat garam

Konsentrat garam dibuat dengan cara mencampurkan 2,80 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5,7 g K_2HPO_4 , dan 2,20 g KH_2PO_4 , kemudian dilarutkan dengan sedikit akuades dalam gelas kimia. Selanjutnya larutan

tersebut dipindahkan dalam labu takar 100 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas.

B.2 Pembuatan larutan elemen renik

Larutan elemen renik dibuat dengan cara mencampurkan 0,01 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,00 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g NaOH , 1,30 g Na_2EDTA dan 0,5 g ZnSO_4 , selanjutnya dilarutkan dengan sedikit akuades. Kemudian ditambahkan dengan 0,5 mL H_2SO_4 pekat dan diaduk sampai larut. Larutan tersebut dipindahkan ke dalam labu takar 100 mL dan ditambahkan dengan akuades hingga tanda batas.

B.3 Pembuatan larutan garam mineral

Larutan garam mineral dilakukan dengan cara mencampurkan 8 mL konsentrat garam, 0,05 g ekstrak yeast dan 1 mL larutan elemen renik. Selanjutnya dilarutkan dengan sedikit akuades. Setelah itu, larutan tersebut dipindahkan ke dalam labu takar 100 mL dan diencerkan dengan akuades hingga tanda batas.

B.4 Pembuatan larutan sukrosa 20%

Serbuk padatan sukrosa ditimbang sebanyak 20 g dan dilarutkan dengan sedikit akuades. Setelah itu larutan dipindahkan ke dalam labu takar 100 mL dan diencerkan dengan akuades hingga tanda batas.

B.5 Pembuatan Larutan Tris 0,1 M

Sebanyak 12,114 g padatan tris ditimbang dan dilarutkan dengan sedikit akuades dalam gelas kimia. Kemudian larutan tersebut dipindahkan ke dalam labu takar 1000 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas.

BM_{Tris}

$$= 121,14 \frac{\text{g}}{\text{mol}}; \text{Volume}_{\text{Tris}} 1000 \text{ mL}; \text{Konsentrasi}_{\text{Tris}} 0,1 \text{ M}$$

$$\text{mol}_{\text{Tris}} = [\text{Tris}] \times \text{Volume}_{\text{Tris}}$$

$$= 0,1 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \times 1 \text{ L} = 0,1 \text{ mol}$$

$$\text{massa}_{\text{Tris}} = \text{mol}_{\text{Tris}} \times \text{BM}_{\text{Tris}}$$

$$= 0,1 \text{ mol} \times 121,14 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 12,114 \text{ g}$$

B.6 Pembuatan Larutan Tris 0,05 M

Sebanyak 6,057 g padatan tris ditimbang dan dilarutkan dengan sedikit akuades dalam gelas kimia. Kemudian larutan tersebut dipindahkan ke dalam labu takar 1000 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas.

BM_{Tris}

$$= 121,14 \frac{g}{mol}; Volume_{Tris} 1000 \text{ mL}; Konsentrasi_{Tris} 0,1 \text{ M}$$

$$mol_{Tris} = [Tris] \times Volume_{Tris}$$

$$= 0,05 \frac{mol}{L} \times 1 \text{ L} = 0,05 \text{ mol}$$

$$massa_{Tris} = mol_{Tris} \times BM_{Tris}$$

$$= 0,05 \text{ mol} \times 121,14 \frac{g}{mol} = 6,057 \text{ g}$$

B.7 Pembuatan Larutan Asam asetat 0,5 M

Larutan asam asetat glacial 99,7% dipipet sebanyak 28,69 mL menggunakan pipet ukur. Selanjutnya dilarutkan dengan sedikit akuades dalam gelas kimia. Lalu dipindahkan ke dalam labu takar 1000 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas serta dikocok hingga homogen.

$$M = \frac{\rho \times 10 \times \%kadar}{Mr}$$

$$M = \frac{1,050 \frac{mg}{ml} \times 10 \times 99,7}{60,05 \text{ mg/mmol}} = 17,433 \text{ mM} = 17,43 \text{ M}$$

$$V \text{ CH}_3\text{COOH yang dipipet} = \frac{0,5 \text{ M}}{17,43 \text{ M}} \times 1000 \text{ mL} = 28,69 \text{ mL}$$

B.8 Pembuatan Larutan Asam Asetat 0,25 M

Larutan asam asetat 0,5 M dipipet sebanyak 500 ml. dilarutkan dengan sedikit akuades dalam gelas kimia dan dipindahkan ke dalam labu takar 1000 mL. Kemudian ditambahkan akuades hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen.

$$V \text{ CH}_3\text{COOH yang dipipet} = \frac{0,25 \text{ M}}{0,5 \text{ M}} \times 1000 \text{ mL} = 500 \text{ mL}$$

B.9 Pembuatan Larutan Buffer Tris-asetat 0,1 M pH 7,5

Larutan tris 0,1 M diambil sebanyak 863,324 ml, kemudian ditambahkan 136,67 mL larutan asam asetat 0,5 M sambil diaduk. Lalu diukur pH larutan dengan pH meter yang telah dikalibrasi hingga pH mencapai 7,5.

Larutan tris = 0,1 M (x) $x + y = 1000 \text{ mL}$; $x=1000-y$

Larutan asam asetat = 0,5 M (y)

$$[OH^-] = Kb \frac{(mol \text{ tris} - mol \text{ asetat})}{mol \text{ asetat}}$$

$$10^{-6,5} = 1,2 \times 10^{-6} \frac{(0,1 x - 0,5 y)}{0,5 y}$$

$$\frac{3,16 \times 10^{-7}}{1,2 \times 10^{-6}} = \frac{0,1 x - 0,5 y}{0,5 y}$$

$$0,1317 y = 0,1 x - 0,5 y$$

$$0,1317 y + 0,5 y = 0,1 (1000 - y)$$

$$0,6317 y = 100 - 0,1 y$$

$$0,7317 y = 100$$

$$y = 136,67 \text{ mL}$$

$$x + y = 1000 \text{ mL}$$

$$x = 1000 - y$$

$$x = 1000 - 136,67 = 863,324 \text{ mL}$$

B.10 Pembuatan Larutan Buffer Tris-asetat 0,1 M pH 8

Larutan tris 0,1 M diambil sebanyak 450,82 ml, kemudian ditambahkan 49,18 mL larutan asam asetat 0,5 M sambil diaduk. Lalu diukur pH larutan dengan pH meter yang telah dikalibrasi hingga pH mencapai 8.

Larutan tris = 0,1 M (x) $x + y = 500 \text{ mL}$; $x=500-y$

Larutan asam asetat = 0,5 M (y)

$$[OH^-] = Kb \frac{(mol \text{ tris} - mol \text{ asetat})}{mol \text{ asetat}}$$

$$10^{-6} = 1,2 \times 10^{-6} \frac{(0,1 x - 0,5 y)}{0,5 y}$$

$$\frac{10^{-6}}{1,2 \times 10^{-6}} = \frac{0,1 x - 0,5 y}{0,5 y}$$

$$0,4167 y = 0,1 x - 0,5 y$$

$$0,4167 y + 0,5 y = 0,1 (500 - y)$$

$$\begin{aligned}
 0,9167 y &= 50 - 0,1 y \\
 1,0167 y &= 50 \\
 y &= 49,18 \text{ mL} \\
 x + y &= 500 \text{ mL} \\
 x &= 500 - y \\
 x &= 500 - 49,18 = 450,82 \text{ mL}
 \end{aligned}$$

B.11 Pembuatan Buffer Tris-Asetat 0,1 M pH 8,5

Larutan tris 0,1 M diambil sebanyak 473,93 ml, kemudian ditambahkan 26,07 mL larutan asam asetat 0,5 M sambil diaduk. Lalu diukur pH larutan dengan pH meter yang telah dikalibrasi hingga pH mencapai 8,5.

$$\text{Larutan tris} = 0,1 \text{ M (x)} \quad x + y = 500 \text{ mL}; \quad x = 500 - y$$

$$\text{Larutan asam asetat} = 0,5 \text{ M (y)}$$

$$[\text{OH}^-] = K_b \frac{(\text{mol tris} - \text{mol asetat})}{\text{mol asetat}}$$

$$10^{-5,5} = 1,2 \times 10^{-6} \frac{(0,1 x - 0,5 y)}{0,5 y}$$

$$\frac{3,16 \times 10^{-6}}{1,2 \times 10^{-6}} = \frac{0,1 x - 0,5 y}{0,5 y}$$

$$1,3176 y = 0,1 x - 0,5 y$$

$$1,3176 y + 0,5 y = 0,1 (500 - y)$$

$$1,8176 y = 50 - 0,1 y$$

$$1,9176 y = 50$$

$$y = 26,07 \text{ mL}$$

$$x + y = 500 \text{ mL}$$

$$x = 500 - y$$

$$x = 500 - 26,07 = 473,93 \text{ mL}$$

B.12 Pembuatan Buffer tris-asetat 0,1 M pH 9

Larutan tris 0,1 M diambil sebanyak 489,51 ml, kemudian ditambahkan 10,49 mL larutan asam asetat 0,5 M sambil diaduk. Lalu diukur pH larutan dengan pH meter yang telah dikalibrasi hingga pH mencapai 9.

$$\text{Larutan tris} = 0,1 \text{ M (x)} \quad x + y = 500 \text{ mL}; \quad x = 500 - y$$

$$\text{Larutan asam asetat} = 0,5 \text{ M (y)}$$

$$[\text{OH}^-] = K_b \frac{(\text{mol tris} - \text{mol asetat})}{\text{mol asetat}}$$

$$10^{-5} = 1,2 \times 10^{-6} \frac{(0,1x - 0,5y)}{0,5y}$$

$$\frac{10^{-5}}{1,2 \times 10^{-6}} = \frac{0,1x - 0,5y}{0,5y}$$

$$4,167y = 0,1x - 0,5y$$

$$4,167y + 0,5y = 0,1(500 - y)$$

$$4,667y = 50 - 0,1y$$

$$4,767y = 50$$

$$y = 10,49 \text{ mL}$$

$$x + y = 500 \text{ mL}$$

$$x = 500 - y$$

$$x = 500 - 10,49 = 489,51 \text{ mL}$$

B.13 Pembuatan Larutan Buffer Tris asetat 0,1 M pH 9,5

Larutan tris 0,1 M diambil sebanyak 496,34 ml, kemudian ditambahkan 3,66 mL larutan asam asetat 0,5 M sambil diaduk. Lalu diukur pH larutan dengan pH meter yang telah dikalibrasi hingga pH mencapai 9,5.

Larutan tris = 0,1 M (x) $x + y = 500 \text{ mL}$; $x = 500 - y$

Larutan asam asetat = 0,5 M (y)

$$[OH^-] = Kb \frac{(mol \text{ tris} - mol \text{ asetat})}{mol \text{ asetat}}$$

$$10^{-4,5} = 1,2 \times 10^{-6} \frac{(0,1x - 0,5y)}{0,5y}$$

$$\frac{3,16 \times 10^{-5}}{1,2 \times 10^{-6}} = \frac{0,1x - 0,5y}{0,5y}$$

$$13,176y = 0,1x - 0,5y$$

$$13,176y + 0,5y = 0,1(500 - y)$$

$$13,676y = 50 - 0,1y$$

$$13,776y = 50$$

$$y = 3,66 \text{ mL}$$

$$x + y = 500 \text{ mL}$$

$$x = 500 - y$$

$$x = 500 - 3,66 = 496,34 \text{ mL}$$

B.14 Pembuatan Larutan Buffer Tris-asetat 0,05 M pH 8,5

Larutan tris 0,05 M diambil sebanyak 895,65 ml, kemudian ditambahkan 104,35 mL larutan asam asetat 0,25 M sambil diaduk. Lalu diukur pH larutan dengan pH meter yang telah dikalibrasi hingga pH mencapai 8,5.

Larutan tris = 0,05 M (x) x + y = 1000 mL; x=1000-y

Larutan asam asetat = 0,25 M (y)

$$[OH^-] = K_b \frac{(mol\ tris - mol\ asetat)}{mol\ asetat}$$

$$10^{-5,5} = 1,2 \times 10^{-6} \frac{(0,05 x - 0,25 y)}{0,25 y}$$

$$3,16 \times 10^{-6} = \frac{0,05 x - 0,25 y}{0,25 y}$$

$$1,2 \times 10^{-6} = \frac{0,05 x - 0,25 y}{0,25 y}$$

$$0,658 y = 0,05 x - 0,25 y$$

$$0,658 y + 0,25 y = 0,05 (1000 - y)$$

$$0,9083 y = 100 - 0,05 y$$

$$0,9583 y = 100$$

$$y = 104,35\ mL$$

$$x + y = 1000\ mL$$

$$x = 1000 - y$$

$$x = 1000 - 104,35 = 895,65\ mL$$

B.15 Pembuatan larutan Buffer tris-asetat 0,02 M pH 7,5

Larutan buffer tris-asetat 0,1 M dipipet sebanyak 200 ml. dan dilarutkan dengan sedikit akuades. Setelah itu dipindahkan ke dalam labu takar 1000 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas serta dikocok hingga homogen.

V buffer tris asetat 0,1 M pH 7,5 yang dibutuhkan

$$= \frac{0,02\ M}{0,1\ M} \times 1000\ mL = 200\ mL$$

B.16 Pembuatan larutan NaOH 10% (w/v)

Padatan NaOH ditimbang 10 g dan dilarutkan dengan sedikit akuades. Selanjutnya larutan dipindahkan dalam gelas kimia 100 mL dan ditambah akuades hingga 100 mL.

B.17 Pembuatan Larutan Biuret

Larutan biuret dibuat dengan cara melarutkan 0,15 g CuSO_4 dan 0,6 g Na-K-Tartrat dengan akuades bebas karbonat dalam gelas kimia 250 mL. kemudian ditambahkan 30 mL larutan NaOH 10% dan ditambahkan akuades hingga tanda batas dalam labu takar 100 mL dan dikocok hingga homogen.

B.18 Pembuatan larutan uji organofosfat

B.18.1 Pembuatan larutan diazinon 40 ppm

Larutan pekat diazinon dipipet dengan mikropipet sebanyak 33,3 μL lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 500 mL, ditambahkan akuades hingga tanda batas kemudian dikocok hingga homogen.

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi diazinon pekat} &= 600 \text{ g/L} \\ &= 600000 \text{ mg/L} \\ &= 600000 \text{ ppm}\end{aligned}$$

$$\text{massa diazinon sebelum diencerkan} = \text{massa diazinon setelah diencerkan}$$

$$40 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL} = 600000 \text{ ppm} \times V \text{ diazinon pekat}$$

$$V \text{ diazinon pekat} = \frac{40 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}}{600000 \text{ ppm}}$$

$$\begin{aligned} &= 0,0067 \text{ mL} \\ &= 6,7 \mu\text{L}\end{aligned}$$

B.18.2 Pembuatan larutan uji diazinon dalam buffer tris-asetat pH 8,5 0,05 M

Larutan uji diazinon yang akan dibuat adalah 0; 6 ; 8 ; 10 ; 15 ; 20 ppm. Larutan uji ini dibuat dengan cara memipet x mL larutan uji diazinon 40 ppm dengan bantuan pipet ukur 10 mL dan 1 mL lalu dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL. Larutan ini lalu ditambahkan dengan larutan buffer Tris asetat pH 8,5 hingga tanda batas.

Perhitungan untuk larutan uji diazinon 6ppm :

$$\text{massa diazinon setelah diencerkan} = \text{massa diazinon sebelum diencerkan}$$

$$6 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL} = 40 \text{ ppm} \times V \text{ diazinon pekat}$$

$$V \text{ diazinon pekat} = \frac{6 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}}{40 \text{ ppm}}$$

$$= 15 \text{ mL}$$

Dengan cara yang sama, sebanyak x mL larutan uji diazinon diambil, lalu ditandabatkan dengan buffer Tris-asetat pH 8,5. Tabel B.1 menunjukkan volume larutan diazinon 40 ppm yang diambil untuk masing-masing konsentrasi larutan uji diazinon.

Tabel B.1 Volume larutan diazinon 40 ppm yang diambil untuk membuat larutan diazinon

Konsentrasi diazinon (ppm)	X mL larutan dizinon 40 ppm yang di ambil
0	0
6	15
8	20
10	25
15	37,5
20	60

B.18.3 Pembuatan Larutan Uji diazinon dalam buffer tris asetat pH 7,5 sampai 9,5

Larutan diazinon 40 ppm dipipet menggunakan pipet ukur sesuai TabelB.2 :

Tabel B.2 Volume larutan diazinon 40 ppm yang diambil untuk membuat larutan diazinon dengan buffer tris asetat dalam variasi pH

Konsentrasi diazinon (ppm)	X mL larutan dizinon 40 ppm yang di ambil
6	15
8	20
10	25
15	37,5
20	60

Kemudian dilarutkan dengan sedikit akuades dan dipindahkan ke dalam labu takar 10 mL. ditambahkan buffer tris-asetat 0,1 M pH 7,5 sampai 9,5 hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen.

B.18.4 Pembuatan larutan malathion 145 ppm

Larutan pekat malathion dipipet dengan mikropipet sebanyak 145 µL lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 500 mL, ditambah akuades hingga tanda batas kemudian dikocok hingga homogen.

$$\begin{aligned}
 \text{Konsentrasi diazinon pekat} &= 500 \text{ g/L} \\
 &= 500000 \text{ mg/L} \\
 &= 500000 \text{ ppm} \\
 \text{massa malathion sebelum diencerkan} &= \text{massa malathion setelah diencerkan} \\
 145 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL} &= 500000 \text{ ppm} \times V \text{ malathion pekat} \\
 V \text{ malathion pekat} &= \frac{145 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}}{500000 \text{ ppm}} \\
 &= 0,029 \text{ mL} \\
 &= 29 \text{ }\mu\text{L}
 \end{aligned}$$

B.18.5 Pembuatan larutan uji malathion dalam buffer tris-asetat pH 8,5 0,05 M

Larutan uji malathion yang akan dibuat adalah 0; 10 ; 15 ; 20 ; 25 ; 30 ppm. Larutan uji ini dibuat dengan cara memipet x mL larutan uji malathion 145 ppm dengan bantuan pipet ukur 10 mL dan 1 mL lalu dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL. Larutan ini lalu ditambahkan dengan larutan buffer Tris asetat pH 8,5 hingga tanda batas.

Perhitungan untuk larutan uji malathion 10ppm :

massa malathion setelah diencerkan = massa malathion sebelum diencerkan

$$10 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL} = 145 \text{ ppm} \times V \text{ diazinon pekat} \\ = \frac{145 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}}{10 \text{ ppm}}$$

$$V \text{ diazinon pekat} = \frac{145 \text{ ppm}}{10 \text{ ppm}} \\ = 6,9 \text{ mL}$$

Dengan cara yang sama, sebanyak x mL larutan uji malathion diambil, lalu ditandabatkan dengan buffer Tris-asetat pH 8,5. Tabel B.3 menunjukkan volume larutan malathion 145 ppm yang diambil untuk masing-masing konsentrasi larutan uji malathion.

Tabel B.3 Volume larutan malathion 145 ppm yang diambil untuk membuat larutan malathion

Konsentrasi malathion (ppm)	X mL larutan malathion 145 ppm yang di ambil
0	0
10	6,9
15	10,3
20	13,8
25	17,2
30	20,7

B.18.6 Pembuatan Larutan Uji malathion dalam buffer tris asetat pH 7,5 sampai 9,5

Larutan malathion 145 ppm dipipet menggunakan pipet ukur sesuai Tabel B.4 :

Tabel B.4 Volume larutan malathion 145 ppm yang diambil untuk membuat larutan malathion dengan buffer tris asetat dalam variasi pH

Konsentrasi malathion (ppm)	X mL larutan malathion 145 ppm yang di ambil
10	6,9
15	10,3
20	13,8
25	17,2
30	20,7

Kemudian dilarutkan dengan sedikit akuades dan dipindahkan ke dalam labu takar 10 mL, ditambahkan buffer tris-asetat 0,1 M pH 7,5 sampai 9,5 hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen.

B.19 Penambahan Ammonium Sulfat fraksi pengendapan 0-45% dan 45-65% pada Ekstrak kasar OPH

a. Fraksi pengendapan 0-45%

$$\frac{277 \text{ g}}{1000 \text{ mL}} = \frac{w}{100 \text{ mL}}$$
$$w = \frac{277 \text{ g} \times 100 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} = 27,7 \text{ g}$$

b. Fraksi pengendapan 45-65%

$$\frac{134 \text{ g}}{1000 \text{ mL}} = \frac{w}{100 \text{ mL}}$$
$$w = \frac{134 \text{ g} \times 100 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} = 13,4 \text{ g}$$

B.19.1 Massa Amonium Sulfat (g) yang Ditambahkan dalam Setiap Liter Larutan

Starting concentration	Ammonium Sulfate Saturation Tables													
	10%	20%	25%	30%	35%	40%	45%	50%	55%	60%	65%	70%	75%	80%
0%	56	114	144	176	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561
10%	—	57	86	118	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494
20%	—	—	29	59	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424
25%	—	—	—	30	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390
30%	—	—	—	—	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356
35%	—	—	—	—	—	31	63	94	129	164	200	238	278	319
40%	—	—	—	—	—	—	31	63	97	132	168	205	245	285
45%	—	—	—	—	—	—	—	32	65	99	134	171	210	250
50%	—	—	—	—	—	—	—	—	33	66	101	137	176	214
55%	—	—	—	—	—	—	—	—	—	33	67	103	141	179
60%	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	34	69	105	143

Values given are the number of grams to be added to 1 liter of solution to change the ammonium sulfate concentration from the starting concentration to final concentration. All values are adjusted for changes in volume at room temperature. The saturation of ammonium sulfate does not vary significantly between 4°C and 25°C, so the values given here can normally be used at both temperatures. Saturated ammonium sulfate is 4.1 to 4.2 (w/v) (add 767 grams to 1 liter of distilled H₂O).

B.20 Penentuan kadar protein menggunakan metode biuret

Kadar protein enzim OPH murni ditentukan dengan metode biuret. Sebanyak 2 mL enzim OPH yang dimurnikan ditambah 8 mL pereaksi biuret dan dikocok. Kemudian diukur absorbansinyadengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum BSA. Sebagai blanko dipipet 200 µL akuades dan ditambah dengan 800 µL pereaksi biuret.

B.21 Pembuatan larutan BSA

B.21.1 Pembuatan larutan BSA 10000 ppm

BSA dipipet sebanyak 4,5 mL dilarutkan dengan 50 mL akuades

dalam gelas kimia 250 mL. Larutan NaOH 0,1 N kemudian ditambahkan beberapa tetes pada larutan campuran, selanjutnya dimasukkan dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas serta dikocok hingga homogen dan diperoleh larutan stok BSA 10000 ppm.

$$\begin{aligned} \text{Volume BSA} &= 10000 \text{ mg/L} \times 0,1 \text{ L} \\ &= 1000 \text{ mg} / 22\% \text{ (kelarutan BSA)} \\ &= 4500 \text{ L} \\ &= 4,5 \text{ mL} \end{aligned}$$

B.21.2 Pembuatan Larutan BSA 5000 ppm

Larutan 5000 ppm dibuat dengan cara mengambil 5 mL larutan BSA 10000 ppm dengan pipet ukur dan dimasukkan dalam labu takar 10 mL. Selanjutnya ditambahkan akuades hingga tanda batas.

$$\begin{aligned} V \text{ BSA } 10000 \text{ ppm} &= \frac{5000 \text{ ppm}}{10000 \text{ ppm}} \times 10 \text{ mL} \\ &= 5,0 \text{ mL} \end{aligned}$$

Dengan cara yang sama, dapat dibuat larutan BSA 1000 – 9000 ppm dengan ketentuan seperti pada Tabel B.5

Tabel B.5 Volume larutan BSA 1000 ppm yang diambil untuk membuat kurva baku BSA

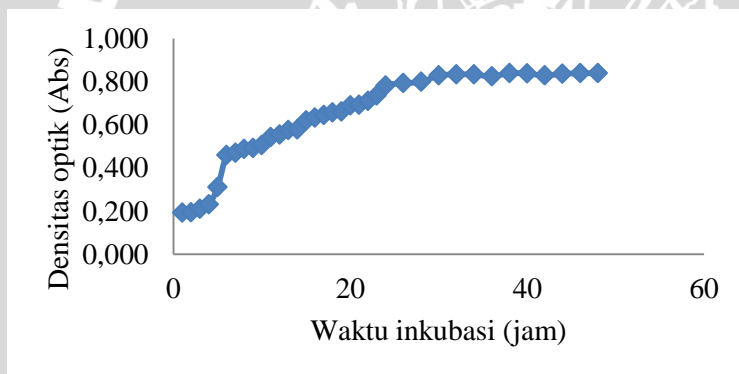
Konsentrasi BSA yang Diinginkan (ppm)	Volume Larutan BSA yang akan dibuat (mL)	Volume Larutan BSA 10000 ppm yang dipipet (mL)
1000	10	1
2000	10	2
3000	10	3
4000	10	4
6000	10	6
7000	10	7
8000	10	8
9000	10	9

Lampiran C. Penentuan pertumbuhan bakteri *Pseudomonas putida*

Tabel C.1: Data Densitas Optik dan Waktu Pertumbuhan Bakteri *Pseudomonas putida*

No	Jam ke-	OD
1	1	0.193
2	2	0.194
3	3	0.211
4	4	0.231
5	5	0.311
6	6	0.459
7	7	0.470
8	8	0.488
9	9	0.493
10	10	0.505
11	11	0.543
12	12	0.554
13	13	0.576
14	14	0.578
15	15	0.620
16	16	0.634
17	17	0.645
18	18	0.657
19	19	0.662
20	20	0.689
21	21	0.692
22	22	0.710
23	23	0.736
24	24	0.782
25	26	0.794

26	28	0.799
27	30	0.829
28	32	0.834
29	34	0.834
30	36	0.825
31	38	0.840
32	40	0.838
33	42	0.829
34	44	0.837
35	46	0.839
36	48	0.840

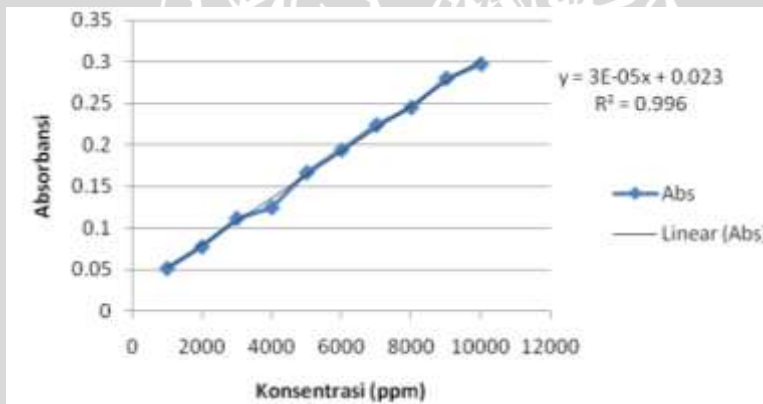


Gambar C.1 Kurva pertumbuhan *Pseudomonas putida*

Lampiran D. Penentuan Kurva Baku BSA

Tabel D.1: Dataabsorbansi larutan BSA

No	Konsentrasi (ppm)	Abs
1	1000	0.052
2	2000	0.078
3	3000	0.112
4	4000	0.125
5	5000	0.167
6	6000	0.194
7	7000	0.224
8	8000	0.245
9	9000	0.280
10	10000	0.297



Gambar D.1 : Kurva Standar BSA

Lampiran E. Penentuan Kadar Protein

E.1 Perhitungan Kadar Protein

Kadar protein enzim OPH ditentukan dengan konversi nilai absorbansi pada kurva baku BSA. Persamaan regresi linearnya:

$$Y = 0,00003X + 0,023$$

Volume enzim yang digunakan untuk penentuan = 2mL

Volume larutan standar BSA_{5000 ppm} yang ditambahkan = 2 mL

Volume larutan yang diukur absorbansinya = 12 mL

Konsentrasi total = Konsentrasi Protein Enzim + BSA 5000 ppm

$Y = 0,0003 X + 0,023$

Contoh : perhitungan kadar protein dengan absorbansi 0,193 adalah:

$$Y = 0,00003x + 0,023$$

$$0,193 = 0,00003x + 0,023$$

$$X = 5666,667 \text{ ppm}$$

Maka konsentrasi enzim = Konsentrasi protein total – Konsentrasi yang ditambahkan

$$= 5666,667 \text{ ppm} - 5000 \text{ ppm}$$

$$= 666,67 \text{ ppm}$$

$$= 0,667 \text{ mg/mL}$$

Tabel E.1 :Absorbansi Uji Kadar Protein

No	Sampel ID	Abs (y)	Konsentrasi Total (x) mg / L	[E] mg / mL	Kadar Protein (mg)
1	sampel 1 (45 %)	0.193	5666.667	0.667	1.333
2	sampel 2 (45 %)	0.193	5666.667	0.667	1.333
3	sampel 3 (45 %)	0.194	5700.000	0.700	1.400
4	sampel 4 (65 %)	0.232	6966.667	1.967	3.933
5	sampel 5 (65 %)	0.235	7066.667	2.067	4.133
6	sampel 6 (65 %)	0.240	7233.333	2.233	4.467

Lampiran F. Penentuan Aktivitas Spesifik OPH

F.1 Perhitungan Aktivitas Spesifik OPH

Rumus perhitungan aktivitas OPH adalah sebagai berikut:

$$AE = \frac{[P]xV}{Mr \text{ pestisida}} \times \frac{fp}{p \times q}$$

V (volume total sampel percobaa) = 2,1 mL

q (waktu reaksi) = 30menit

p (volume enzim OPH) = 0,1 mL
 fp (faktor pengenceran) = 1 kali
 Mr (diazinon dan malathion) = 304 dan 330 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$

Contoh : Perhitungan aktivitas OPH pada fraksi pengendapan amonium sulfat 0-45%, substrat diazinon dengan absorbansi 0,260 adalah:

Diketahui persamaan regresi :

$$y = 0,013x - 0,006$$

Kadar produk :

$$y = 0,013x - 0,006$$

$$0,260 = 0,013x - 0,006$$

$$x = 20,462 \text{ (mg/L)}$$

Aktivitas OPH :

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas} &= \frac{20,462(\text{mg/L}) \times 2,1\text{mL}}{304(\mu\text{g}/\mu\text{mol})} \times \frac{1}{0,1\text{mL} \times 30\text{menit}} \\ &= 0,047 \mu\text{mol/menit} \end{aligned}$$

Kadar protein yang diperoleh untuk fraksi pengendapan 0-45% adalah 1,355 mg dan fraksi 45-65% adalah 4,177 mg.

Contoh perhitungan Aktivitas Spesifik enzim OPH pada substrat diazinon dengan fraksi pengendapan 0-45%.

$$\text{Aktivitas enzim OPH} = 0,047 \text{ unit}$$

$$\text{Kadar protein fraksi pengendapan 0-45\%} = 1,355 \text{ mg}$$

$$\text{Aktivitas spesifik enzim OPH} = \frac{0,047(\text{unit})}{1,355(\text{mg})}$$

Tabel F.1: Aktivitas Spesifik OPH

Fraksi	Substrat	Aktivitas Spesifik (unit/ mg)
0-45%	Diazinon	0,035
45 - 65%	Diazinon	0,009
0 - 45%	Malathion	0,067
45 - 65%	Malathion	0,016

Lampiran G. Penentuan pH optimum

Tabel G.1 :Analisa data aktivitas enzim OPH dengan substrat diazinon pada berbagai pH

No	pH	Absorbansi rata - rata	[P] (mg/L)	[P] (mmol/L)	AE (U) (µmol/menit)	AE spesifik (U/mg enzim)
1	7.5	0.199	14.600	0.048	0.034	0.025
2	8	0.205	16.923	0.056	0.039	0.029
3	8.5	0.222	17.462	0.057	0.040	0.030
4	9	0.260	20.462	0.067	0.047	0.035
5	9.5	0.263	18.857	0.062	0.043	0.032

Tabel G.2: Analisa data aktivitas enzim OPH dengan substrat malathion pada berbagai pH

No	pH	Absorbansi rata - rata	[P] (mg/L)	[P] (mmol/L)	AE (U) (µmol/menit)	AE spesifik (U/mg enzim)
1	7.5	0.283	42.571	0.129	0.090	0.067
2	8	0.515	33.625	0.102	0.071	0.053
3	8.5	0.631	32.000	0.097	0.068	0.050
4	9	0.628	30.571	0.093	0.065	0.048
5	9.5	0.574	31.368	0.095	0.067	0.049

Lampiran H. Penentuan nilai K_M dan V_{maks}

Tabel H.1 Perhitungan regresi untuk menentukan K_M dan V_{maks} pada substrat diaziron

No	[S] (ppm)	1/[S] (x)	1/ V_0 (y)	xy	x^2	(x-X) (y-Y)	(x-X) ²	(y-Y) ²
1	6	0.167	624	104	0.028	7.879	0.004171	14884
2	8	0.125	570	71.25	0.016	1.558	0.000525	4624
3	15	0.067	446	29.73	0.004	1.983	0.001254	3136
4	20	0.050	368	18.4	0.003	6.979	0.002713	17956
Total		0.408	2008	223.38	0.050	18.400	0.008663	40600
rata-rata		0.102	502					

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{maks}} + \frac{K_M}{V_{maks}} \frac{1}{[S]}$$

$$Y = a + bX$$

dimana :

$$a = \frac{\sum x^2 \cdot \sum y - \sum x \cdot \sum xy}{n \cdot (\sum x^2) (\sum x)^2} = \frac{(0,050 \times 2008) - (0,408 \times 223,38)}{4(0,050) - (0,408)^2} = 280,6$$

$$b = \frac{n \sum xy - \sum x \cdot \sum y}{n \cdot (\sum x^2) (\sum x)^2} = \frac{4(223,38) - (0,408 \times 2008)}{4(0,050) - (0,408)^2} = 2250$$

Sehingga :

$$\frac{1}{V_{maks}} = 280,6 \quad V_{maks} = 0,0035$$

$$\frac{K_M}{V_{maks}} = 2250 \quad K_M = 2250 \times 0,0035 = 7,8$$

$$\text{Kolerasi (r)} = \frac{\sum (x-x)(y-y)}{\sqrt{\sum (x-x)^2 \cdot \sum (y-y)^2}} = \frac{18,4}{\sqrt{(0,008663 \times 40600)}} = 0,98$$

$$r^2 = 0,963$$

Tabel H.2 Perhitungan regresi untuk menentukan V_{maks} dan K_M pada susbrat malathion

No	[S] (ppm)	1/[S] (x)	1/ V_0 (y)	xy	x^2	$(x-\bar{X})$ $(y-\bar{Y})$	$(x-\bar{X})^2$	$(y-\bar{Y})^2$
1	10	0.100	166.587	16.659	0.010	1.544	0.001600	1490.384
2	15	0.067	143.776	9.585	0.004	0.105	0.000044	249.478
3	25	0.040	109.652	4.386	0.002	0.367	0.000400	335.958
4	30	0.033	91.910	3.064	0.001	0.962	0.000711	1301.134
Total		0.240	511.924	33.693	0.017	2.978	0.002756	3376.954
rata-rata		0.060	127.98					

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{maks}} + \frac{K_M}{V_{maks}} \frac{1}{[S]}$$

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{maks}} + \frac{K_M}{V_{maks}} \frac{1}{[S]}$$

$$Y = a + bX$$

dimana :

$$a = \frac{\sum x^2 \cdot \sum y - \sum x \cdot \sum xy}{n \cdot (\sum x^2) (\sum x)^2} = \frac{(0,017 \times 511,924) - (0,240 \times 33,693)}{4(0,017) - (0,240)^2} = 59,32$$

$$b = \frac{n \sum xy - \sum x \cdot \sum y}{n \cdot (\sum x^2) (\sum x)^2} = \frac{4 \cdot (33,693) - (0,240 \times 511,924)}{4(0,017) - (0,240)^2} = 1145,4$$

Sehingga :

$$\frac{1}{V_{maks}} = 59,32$$

$$V_{maks} = 0,0168$$

$$\frac{K_M}{V_{maks}} = 1145,4$$

$$K_M = 1145,4 \times 0,0168 = 19,24$$

$$\text{Kolerasi (r)} = \frac{\sum(x-x)(y-y)}{\sqrt{\sum(x-x)^2 \cdot \sum(y-y)^2}} = \frac{2,978}{\sqrt{(0.002756) \times 3376.954}} = 0,976$$

$$r^2 = 0.953$$

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

