

KARAKTERISASI ENZIM ORGANOFOSFAT HIDROLASE DARI *Pseudomonas putida* PADA SUBSTRAT DIAZINON DAN MALATHION

Anik Sri Wijaya, Sasangka Prasetyawan*, Anna Roosdiana

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya
Jl. Veteran Malang 65145

*Alamat korespondensi, Tel : +62-341-575838, Fax : +62-341-575835
Email: sasangka@ub.ac.id

ABSTRAK

Organofosfat hidrolase (OPH) merupakan enzim intraseluler yang diisolasi 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 tingkat kejenuhan 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 $K_M = 7,4 \text{ mg/L}$ untuk diazinon, sedangkan untuk malathion $V_{maks} = 16,8 \times 10^{-3} \mu\text{mol}/\text{menit}$ dan $K_M = 19,24 \text{ mg/L}$.

Kata kunci: diazinon, malathion, OPH

ABSTRACT

Organophosphate hydrolase (OPH) is an intracellular enzyme isolated from *Pseudomonas putida*. This enzyme degrades organophosphate pesticides. The isolated OPH was purified by fractionation method using 0-45% and 45-65% of saturated ammonium sulphate. Enzyme activity was determined by reacts OPH with substrate of diazinon or malathion at various concentration and pH at room temperature for 30 minutes. Determination of 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) was performed by reacts OPH with various concentration of diazinon (6; 8; 10; 15; 20) ppm and malathion (10; 15; 20; 25; 30) ppm. The results showed that the level of saturated ammonium sulphate 0-45% has optimum activity of 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 kinetics parameter of OPH was $V_{max} = 3.5 \times 10^{-3} \mu\text{mol} / \text{minute}$ 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: diazinon, malathion, OPH

PENDAHULUAN

Organofosfat hidrolase (OPH) mampu mengkatalisis reaksi hidrolisis pestisida organofosfat. Pada reaksi hidrolisis ini, enzim akan menghidrolisis ikatan fosfoester dari organofosfat serta mengurangi toksisitas organofosfat. [1]. Pada penelitian biologi molekuler, OPH telah dikembangkan terus-menerus. Beberapa OPH telah diisolasi dan dimurnikan dari berbagai mikroorganisme [2]. Berbagai bakteri organofosfat yang dapat menurunkan

toksitas organofosfat, termasuk *Pseudomonas diminuta* MG, *Flavobacterium* sp, *Arthrobacter* sp, *Penicillium lilacinum* BP303, telah diisolasi dari lingkungan yang terdapat senyawa organofosfat [3]. Organofosfat merupakan jenis pestisida yang direkomendasikan oleh Departemen pertanian Republik Indonesia [4].

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 dipisahkan dengan enzim [5].

Pada penelitian ini dipelajari lebih lanjut mengenai Aktivitas spesifik, uji kadar protein dan karakterisasi enzim OPH dengan menggunakan substrat diazinon dan malathion. Sehingga dapat 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*.

METODA PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitik (Bosch PE 620), inkubator (Heraeus Type 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) Thermoscintific 10000/putaran), spektrofotometer UV-Vis dan peralatan gelas laboratorium. Bahan yang digunakan pada penelitian ini dengan kualitas *for microbiology* seperti *yeast extract*, nutrient agar, dan larutan BSA 22% (b/v), sedangkan kualitas pro analisis, antara lain organofosfat diazinon, organofosfat malathion, NaOH, HCl 0,1M, H₂SO₄ 96%, CuSO₄.5H₂O, asam asetat glacial 99,7%, (NH₄)₂SO₄, K₂HPO₄, KH₂PO₄, sukrosa, akuades, Na-K-Tartrat, FeSO₄.7H₂O, MgSO₄.4H₂O, Na₂M₂O₄.2H₂O, ZnSO₄.7H₂O, tris amino metan.

Prosedur

Uji kadar protein

Penentuan kadar protein dilakukan menggunakan reagen Biuret. Sebanyak 2 mL larutan enzim dengan tingkat kejenuhan ammonium sulfat 0-45% dan 45-65% 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.

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 dengan tingkat kejenuhan 0-45% serta 45-65%. Diinkubasi selama 30 menit, kemudian diukur absorbansi pada panjang gelombang maksimum substrat diazinon 247 nm dan malathion 221 nm.

Karakterisasi enzim OPH

Karakterisasi Organofosfat hidrolase ditentukan dengan menguji 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 hasil fraksinasi 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 hubungan antara konsentrasi substrat [S] terhadap kecepatan enzim (V). Dengan demikian harga $1 / V_{maks}$ dan nilai V_{maks} didapat, demikian juga nilai $1 / K_M$ dan K_M .

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan Kadar Protein dan Aktivitas Spesifik Enzim OPH

Kadar protein ditentukan dengan menginterpolasikan serapan sampel pada kurva baku BSA $Y = 3.10^{-5} X + 0,023$. Kadar protein yang diperoleh untuk tingkat kejenuhan 0-45% adalah 1,355 mg dan 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 tingkat kejenuhan amonium sulfat dapat dilihat pada Tabel 1.

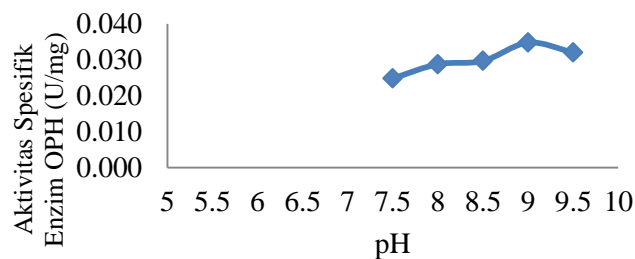
Tabel 1. Aktivitas spesifik enzim OPH pada tingkat kejenuhan amonium sulfat 0-65% menggunakan substrat diazinon dan malathion

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

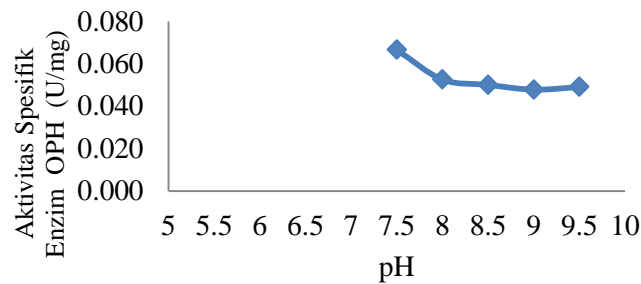
Penentuan pH optimum dengan variasi konsentrasi substrat

pH optimum merupakan pH dimana enzim memiliki aktivitas paling tinggi. Pada pH optimum muatan sisi aktif enzim sesuai dengan substrat sehingga interaksi yang terjadi optimal. 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, terdapat pada tingkat kejenuhan 0-45%. Oleh karena itu untuk menentukan pH optimumnya maka dilakukan pada 0-45%. Pengaruh pH terhadap aktivitas spesifik enzim OPH dapat dilihat pada Gambar 1 dan Gambar 2:



Gambar 1. Aktivitas spesifik enzim OPH menggunakan substrat diazinon fraksi pengendapan 0-45% pada variasi pH (7,5; 8; 8,5; 9; 9,5)

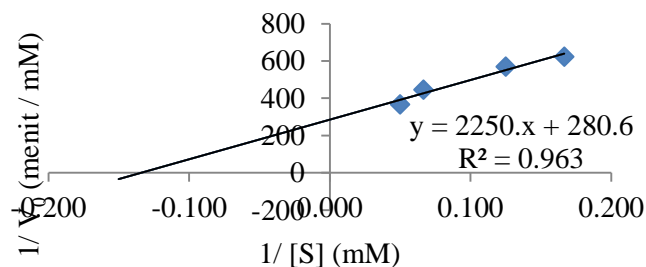


Gambar 2. Aktivitas spesifik enzim OPH menggunakan substrat malathion fraksi pengendapan 0-45% pada variasi pH (7,5; 8; 8,5; 9; 9,5)

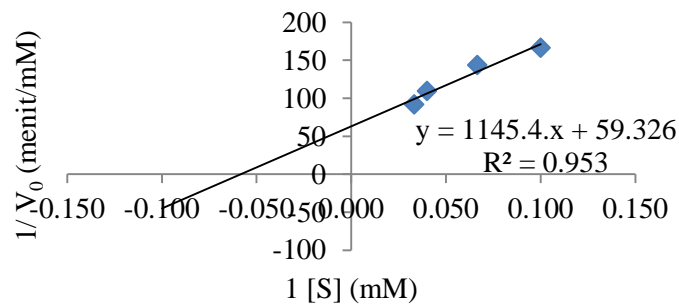
Berdasarkan Gambar 1 dan Gambar 2 menunjukkan bahwa aktivitas spesifik tertinggi diazinon sebesar 0,035 unit/mg pada pH 9 dan malathion sebesar 0,067 unit/mg pada pH 7,5.

Penentuan Kinetika Kimia (V_{maks} dan K_M)

Penentuan V_{maks} dan K_M diperlukan untuk mengetahui karakteristik suatu enzim. Nilai V_{maks} dan K_M menggambarkan kemampuan dan kecepatan enzim terhadap substrat. V_{maks} merupakan kecepatan reaksi pada saat enzim telah jenuh dengan substrat. K_M menunjukkan konsentrasi substrat yang menyebabkan kecepatan reaksi enzimatis mencapai setengah maksimum. Penentuan V_{maks} dan K_M 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 V_{maks} dan K_M dapat dipermudah dengan menggunakan penyederhanaan Lineweaver dan Burk, dimana V_{maks} dan K_M ditentukan dengan membuat persamaan garis lurus hubungan antara $1/[S]$ dan $1/V$ dapat dilihat pada Gambar 3 dan Gambar 4.



Gambar 3. Hubungan antara $1/[S]$ dengan $1/[V]$ untuk substrat diazinon



Gambar 4. 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 $7,8 \text{ mg}/\text{L}$, sedangkan untuk substrat malathion diperoleh nilai V_{maks} dan K_M sebesar $0,0168 \mu\text{mol}/\text{menit}$ dan $19,24 \text{ mg}/\text{L}$.

KESIMPULAN

1. Enzim organofosfat hidrolase dapat mendegradasi organofosfat diazinon menjadi 2-isopropil-6-pirimidin-4-il dan O,O-dietil fosforoditioat, aktivitas spesifiknya pada tingkat kejenuhan amonium sulfat 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 $7,8 \text{ mg}/\text{L}$, dan substrat malathion pada pH 7,5 dengan nilai V_{maks} dan K_M adalah $0,0168 \mu\text{mol}/\text{menit}$ dan $19,24 \text{ mg}/\text{L}$.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami sampaikan kepada Dra. Anna Roosdiana, M.App.Sc selaku Kepala Laboratorium Biokimia, serta kepada Ditjen Dikti Depdiknas yang telah membantu penulis dalam penyediaan dana melalui kerjasama dengan Dr. Ani Mulyasuryani, MS, serta kepada Staff Laboratorium Biokimia, jurusan Kimia FMIPA, Universitas Brawijaya, Malang.

DAFTAR PUSTAKA

1. Murni, S. W., Kholisoh S. D., Tanti D.L., dan Petrissia E.M., 2011, Produksi, Karakterisasi, dan Isolasi Lipase dari *Aspergillus niger*, *Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia "Kejuangan"*, Yogyakarta, 22 Februari 2011
2. Mohammadi, S. H., 2012, Isolation, purification, and Characterization of Proline Dehydrogenase from a *Pseudomonas putida* POS-F84 Isolate, *Iranian Journal of Biotechnology*, Vol.10(2) :111 – 119
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. Gahlaut, Anjum,Ashih Gothwal, Anil K. Chhillar, Vikas Hooda, 2012, Electrochemical Biosensor for Determination of Organophosphorus Compounds : Review, *Applied Bioesensor*, Vol. 1 : 1-8
5. Poedjiadi, A. dan Supriyanti F. M. T., 2006, Dasar-Dasar Biokimia, UI-Press, Jakarta.