

KARAKTERISASI ENZIM ORGANOFOSFAT HIDROLASE (OPH) DARI PSEUDOMONAS PUTIDA PADA SUBSTRAT KLORPIRIFOS DAN PROFENOFOS

Kartika Kusuma Wardani, Sasangka Prasetyawan*, Chanif Mahdi

*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 diperoleh dengan cara isolasi dari bakteri *Pseudomonas putida*. Enzim ini mampu mendegradasi pestisida golongan organofosfat. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan enzim OPH dalam mendegradasi pestisida golongan organofosfat klorpirifos dan profenofos, serta mengetahui kondisi kerja optimum dan kinetika kimia reaksi enzimatisnya. Enzim OPH dimurnikan melalui fraksinasi bertingkat menggunakan ammonium sulfat dengan fraksi pengendapan 0-45% dan 45%-65%. Uji aktivitas enzim OPH dilakukan dengan mereaksikan enzim dan substrat profenofos dan klorpirifos pada pH optimumnya. Kinetika reaksi enzimatis enzim OPH dengan substrat klorpirifos dan profenofos ditentukan dengan cara mereaksikan enzim OPH dengan substrat profenofos dan klorpirifos dengan variasi konsentrasi 2-10 ppm, kemudian ditentukan V_{maks} dan K_M . Hasil penelitian menunjukkan aktivitas enzim spesifik untuk substrat klorpirifos adalah 0,017 unit sedangkan untuk substrat profenofos 0,024 unit. pH optimum OPH untuk substrat klorpirifos yaitu pH 7,5 sedangkan pH optimum untuk substrat profenofos yaitu pH 8,5. Parameter kinetika reaksi enzimatis enzim OPH untuk substrat klorpirifos $V_{max} = 1,34 \times 10^{-3} \mu\text{g. mL}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1}$, $K_M = 2,17 \text{ mg/L}$ dan profenofos $V_{max} = 1,87 \times 10^{-3} \mu\text{g. mL}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1}$, $K_M = 3,08 \text{ mg/L}$. Hasil analisa dengan menggunakan pola rancangan acak lengkap (RAL) menunjukkan bahwa perlakuan pH berpengaruh nyata terhadap aktivitas OPH ($p < 0,05$).

Kata kunci: aktivitas enzim spesifik, OPH, organofosfat, *Pseudomonas putida*

ABSTRACT

Organophosphate hydrolase (OPH) is an intracellular enzyme which can be obtained from isolation of *Pseudomonas putida* bacteria. This enzyme can degrade organophosphate group pesticides. This research was conducted to examine the ability of OPH in degrading the organophosphate pesticides chlorpyrifos and profenofos, and to determine the optimum conditions of the chemical kinetics of the enzyme. The obtained OPH were purified through a graded fractionation by using centrifugation filtrate methods using ammonium sulphate, with fraction of precipitation of 0-45% and 45-65%. Enzyme activity tests were conducted by reacting the enzyme and substrate group organophosphate pesticides chlorpyrifos and profenofos, at the optimum pH conditions for enzyme. The chemical kinetics enzymatic reactions were conducted by reacting the enzyme and substrate at various concentration of 2-10 ppm, from which the values of V_{maks} and K_M are determined. The results showed a specific activity of the enzyme with chlorpyrifos substrate which was 0.017 unit, and 0.024 unit for profenofos substrate, with the optimum pH for this enzyme with chlorpyrifos substrate was 7.5, while for the profenofos substrate was 8.5, with fraction of precipitation of 0-45%. The results of the chemical kinetics of enzymatic reactions are $V_{max} = 1.34 \times 10^{-3} \mu\text{g. mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, $K_M = 2.17 \text{ mg/L}$ for chlorpyrifos substrate; and $V_{max} = 1.87 \times 10^{-3} \mu\text{g. mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, $K_M = 3.08 \text{ mg/L}$ for the profenofos substrate. The results of analysis by employing the complete random design (RAL) method showed that pH treatment has real influence over OPH activity ($p < 0,05$).

Keywords: specific activity of enzyme, OPH, organophosphate, *Pseudomonas putida*,

PENDAHULUAN

Organofosfat hidrolase (OPH) merupakan enzim yang mampu mengkatalisis reaksi hidrolisis pestisida organofosfat [1]. Organofosfat merupakan pestisida yang banyak digunakan di Indonesia, penggunaan pestisida organofosfat seperti klorpirifos dan profenofos telah dimanfaatkan untuk membunuh hama pada hasil pertanian terutama sayuran, namun penggunaan pestisida yang berlebihan dari batas maksimum residu yang ditentukan dapat memberikan dampak negatif bagi makhluk hidup. Paparan residu organofosfat dapat menghambat aktivitas asetilcholinesterase sehingga transmisi impuls syaraf menjadi terganggu, untuk menganalisis residu organofosfat dapat digunakan biosensor [2,3]. Biosensor adalah alat pendeteksi residu pestisida organofosfat yang menggabungkan komponen biologis (enzim organofosfat hidrolase) dan elektronik untuk menghasilkan sinyal yang terukur, yang dapat mendeteksi, mencatat, dan mengirimkan informasi secara cepat [4]. Biosensor potensiometri yang telah dikembangkan untuk menganalisis residu diazinon menggunakan enzim *organofosfat hidrolase* [5]. Biosensor amperometri malathion telah dilakukan oleh Gahlaut, dkk.; 2012 [1]. Sampai saat ini belum ada penelitian biosensor menggunakan substrat profenofos maupun klorpirifos, untuk itu diperlukan enzim organofosfat hidrolase dengan inducer profenofos serta klorpirifos sebagai bioaktif dari biosensor.

Penelitian ini akan memperelajari lebih lanjut tentang karakterisasi enzim OPH. Pemurnian enzim OPH dilakukan pengendapan dengan fraksinasi bertingkat menggunakan ammonium sulfat serta untuk mengetahui kemampuan enzim OPH untuk mendegradasi pestisida organofosfat klorpirifos dan profenofos yang meliputi pengaruh konsentrasi dan pH pada substrat dari hasil isolasi dengan bakteri *Pseudomonas putida*. Bakteri ini merupakan jenis dari bakteri yang mampu mendegradasi ikatan fofodiester pada organofosfat.

METODA PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah pH meter (Inolab WTW), neraca analitik (Bosch PE 620), magnetik stirer (Ikamag RH), autoclave (Model LS-C35L Electric Heater Vertical Sterilizer), shaker (Edmund tipe 25), sentrifugator dingin (Refrigerated sentrifuse (Bio fuge primo) Thermoscientific 10000/putaran), sentrifugator dingin (Jouan tipe MR 18-22), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu) dan peralatan gelas laboratorium serta bahan yang

digunakan dalam penelitian ini adalah organofosfat klorpirifos dan profenofos, bakteri *Pseudomonas putida*, padatan tris amino metan, padatan NaOH (PA), H₂SO₄96%, padatan CuSO₄.5H₂O (PA), asam asetat glacial 99,7%, (NH₄)₂SO₄(PA), K₂HPO₄(PA), padatan sukrosa, akuades, dan Na-K-Tartrat (PA), FeSO₄.7H₂O (PA), MgSO₄.4H₂O (PA), Na₂MoO₄.2H₂O (PA), ZnSO₄.7H₂O (PA), ekstrak yeast, nutrien agar, larutan BSA

Prosedur

Karakterisasi enzim OPH

Karakterisasi OPH dapat ditentukan uji aktivitasnya pada pH 7,5 - 9,5 pada temperatur 30 °C dengan waktu inkubasi selama 30 menit, dan variasi konsentrasi substrat 0-10 ppm serta dihitung nilai V_{maks} dan K_M . Tahapan karakterisasi terhadap variasi konsentrasi enzim dapat dilakukan dengan cara penambahan 2 mL substrat dengan masing-masing konsentrasi 2-10 ppm untuk substrat profenofos dan klorpirifos yang telah dilarutkan dengan buffer tris asetat dengan variasi pH 7,5 – 9,5. Substrat dengan variasi pH dan konsentrasi dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan enzim OPH hasil fraksinasi pengendapan 0-45% dan 45-65% masing – masing 0,1mL. Selanjutnya diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimal masing–masing substrat profenofos 221 nm dan klorpirifos 228nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan Aktivitas Spesifik Enzim

Aktivitas spesifik didefinisikan sebagai jumlah unit aktivitas enzim permiligram enzim. Sehingga aktivitas spesifik enzim dapat ditentukan dengan membagi unit aktivitas enzim dengan kadar proteinnya. Aktivitas enzim OPH dapat diketahui dengan cara mengukur berkurangnya jumlah substrat dari reaksi hidrolisis pada pestisida organofosfat dengan menggunakan substrat klorpirifos dan profenofos. Satu unit aktivitas enzim menunjukkan jumlah enzim (ml) yang dapat mengubah 1 mmol profenofos dan klorpirifos per menit.

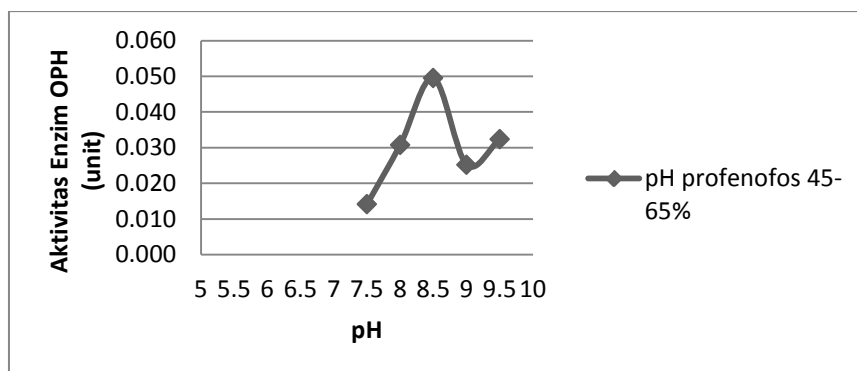
Tabel 1 Aktivitas spesifik enzim OPH pada fraksi pengendapan ammonium sulfat 0-45% dan 45-65% menggunakan substrat profenofos dan klorpirifos

Fraksi	Substrat	Aktivitas Enzim ($\mu\text{mol}/\text{menit}$)	Kadar Protein (mg)	Aktivitas Spesifik (unit)
0 - 45%	Profenofos	0,032	1,333	0,024
45 - 65%	Profenofos	0,042	4,178	0,010
0 - 45%	Klorpirifos	0,023	1,333	0,017
45 - 65%	Klorpirifos	0,008	4,178	0,002

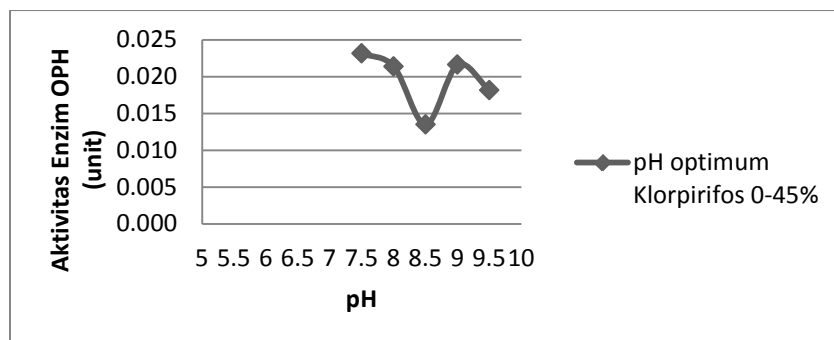
Penentuan pH optimum dengan Variasi Konsentrasi Substrat

pH merupakan salah satu kondisi untuk menentukan karakteristik enzim dalam bekerja secara maksimal. Tinggi rendahnya pH dapat mempengaruhi aktivitas enzim, karena adanya perubahan konformasi gugus aktif pengikat substrat. Penentuan pH optimum dalam penelitian ini dilakukan dengan memberikan pengaruh pH terhadap aktivitas. pH optimum merupakan pH dimana enzim dan substrat berada pada tingkat ionisasi yang diinginkan yaitu gugus pemberi dan penerima proton pada sisi aktif enzim dan substrat sesuai.

Konsentrasi substrat digunakan untuk mengetahui konsentrasi optimum substrat yang berikatan atau bereaksi dengan enzim OPH. Konsentrasi substrat profenofos dan klorpirifos dibuat dengan kisaran 2; 4; 6; 8; 10 ppm dengan variasi pH 7,5; 8,0; 8,5; 9,0; 9,5. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim OPH dapat dilihat dari gambar 1 untuk substrat profenofos dan gambar 2 untuk substrat klorpirifos.



Gambar 1 Aktivitas enzim OPH pada berbagai pH untuk substrat profenofos

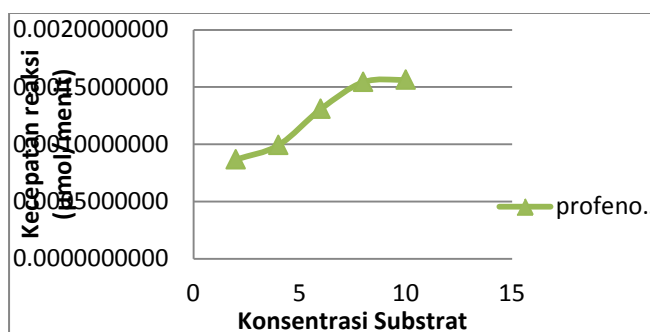


Gambar 2 Aktivitas enzim OPH pada berbagai pH untuk substrat klorpirifos

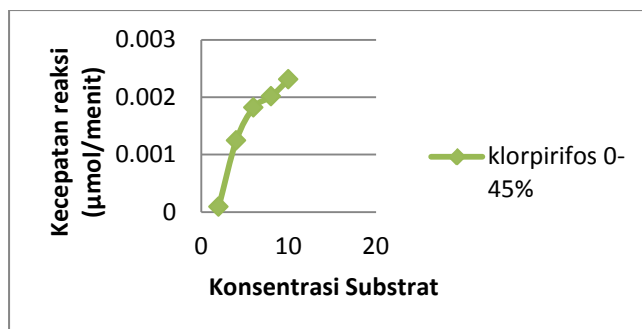
Penentuan Kinetika Kimia (K_M dan V_{maks})

Nilai K_M dan V_{maks} diperlukan untuk mengetahui karakteristik suatu enzim. Besarnya nilai K_M dan V_{maks} dapat menggambarkan kemampuan enzim untuk berikatan dengan substrat. K_M merupakan konstanta Michaelis yang menunjukkan konsentrasi substrat yang menyebabkan terjadinya kecepatan reaksi enzimatik mencapai setengah maksimum, sedangkan V_{maks} merupakan kecepatan reaksi pada saat enzim telah habis bereaksi dengan substrat.

Penentuan K_M dan V_{maks} pada penelitian ini dilakukan dengan cara mengukur aktivitas enzim dengan variasi konsentrasi untuk substrat profenofos dan klorpirifos sebesar 2; 4; 6; 8; 10 ppm pada pH optimum yaitu pH 8,5(substrat profenofos) dan pH 7,5 (substrat klorpirifos) dengan temperatur 25 °C dan waktu inkubasi 30 menit.

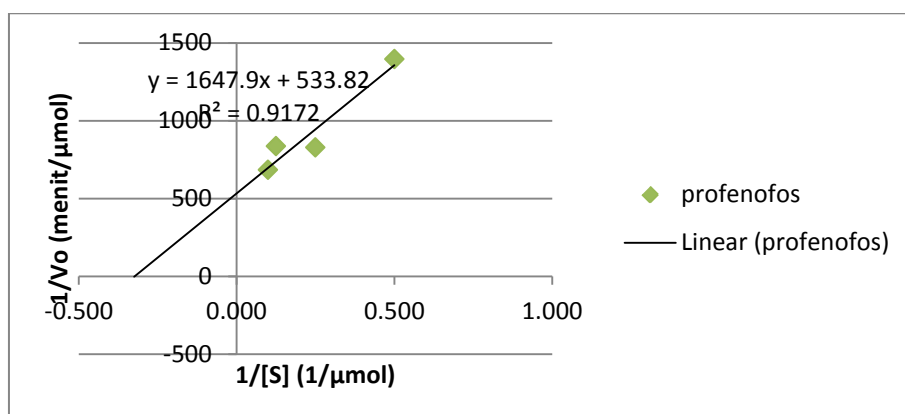


Gambar 3 Aktivitas enzim OPH pada berbagai konsentrasi substrat profenofos (pH 8,5; 25 °C; 30 menit)

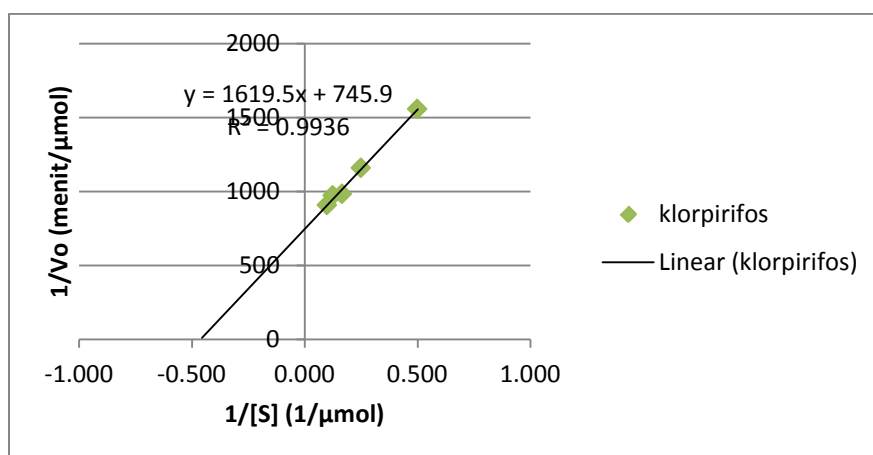


Gambar 4 Aktivitas enzim OPH pada berbagai konsentrasi substrat klorpirifos (pH 7,5; 25 °C; 30 menit)

Semakin besar konsentrasi substrat maka aktivitas enzim OPH akan semakin meningkat. Ketika konsentrasi substrat tinggi, temperatur dan pH dijaga tetap konstan maka laju reaksi proporsional dengan konsentrasi enzim. Nilai V_{maks} dan K_M ditentukan menggunakan transformasi Lineweaver-Burk, dimana V_{maks} dan K_M ditentukan dari persamaan garis lurus hubungan antara $1/[S]$ dengan $1/[V]$ (Gambar 5 dan Gambar 6).



Gambar 5 Hubungan antara $1/[S]$ dengan $1/V_0$ untuk substrat Profenofos



Gambar 6 Hubungan antara $1/[S]$ dengan $1/V_0$ untuk substrat Klorpirifos

Berdasarkan grafik hubungan antara $1/[S]$ dengan $1/V_0$ diperoleh nilai V_{maks} dan K_M untuk substrat profenofos adalah sebesar $1,87 \times 10^{-3} \mu\text{g. mL}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1}$ dan $3,08 \text{ mg/L}$, sedangkan untuk substrat klorpirifos diperoleh nilai V_{maks} dan K_M sebesar $1,34 \times 10^{-3} \mu\text{g. mL}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1}$ dan $2,17 \text{ mg/L}$.

KESIMPULAN

Enzim organofosfat hidrolase mempunyai pH optimum pada pH 8,5 untuk substrat profenofos dan pH 7,5 untuk substrat klorpirifos. Konsentrasi optimum yaitu 10 ppm untuk kedua substrat profenofos maupun klorpirifos. Nilai V_{maks} dan K_M yang diperoleh untuk substrat profenofos adalah $1,87 \times 10^{-3} \mu\text{g. mL}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1}$ dan $3,08 \text{ mg/L}$, sedangkan untuk substrat klorpirifos diperoleh nilai V_{maks} dan K_M sebesar $1,34 \times 10^{-3} \mu\text{g. mL}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1}$ dan $2,17 \text{ mg/L}$.

UCAPAN TERIMAKASIH

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

DAFTAR PUSTAKA

1. Ningfeng, W., Minjie, D., Xiuyun, S., Guoyi, L., Bin Y., Dan Yunliu, F., 2004, Isolation, Purification And Characterization Of A New Organophosphorus Hydrolase Ophc2, *Chinese Science Bulletin*, 49 (3) : 268_272.
2. Environmental Protection Agency (Epa). Method 1699: Pesticides In Water, Soil, Sediment, Biosolids, And Tissue By Hrgc/Hrms. Epa-821-R-08-001 December 2007.
3. Najavand S., 2012, A high potential organophosphorus pesticide-degrading enzyme from a newly characterized, *Pseudomonas aeruginosa* NL01, *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 6(20), halaman 4261-4269.
4. Ekosari, R. 2010. Biosensor Untuk Biotek, Binaaksara, Bandung.
5. Azis, Thamrin, 2012, Desain dan Karakterisasi Biosensor Berbasis Immobilisasi Enzim Untuk Analisis Residu Pestisida Diazinon Dalam Tanaman Kubis (*Brassica oleracea*), *Paradigma*, Jurnal, Vol. 16(1) Hal : 57-66.