

**IMMOBILISASI ASETILKOLINESTERASE DENGAN METODE
SOL-GEL SEBAGAI BAHAN BIOSENSOR PESTISIDA
ORGANOFOSFAT DAN KARBAMAT**

SKRIPSI

Diajukan Guna Memenuhi Persyaratan Penyelesaian Program Sarjana Sains
Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Jember

Oleh :

FUAD M MUHSIN
NIM. 991810301088



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2005**

MOTTO

Ujian dalam perjuangan adalah anugerah atau sebuah ungkapan rasa cinta Allah SWT kepada hambaNya. Tidak pantas seorang mukmin lari dari padanya, karena ia berasal dari Allah dan untuk Allah. Ujian dalam perjuangan adalah suatu garis, suatu proses untuk mencapai suatu titik kesempurnaan dan tak kunjung putus, hingga hayat dikandung badan.

Maka, untuk apa takut, sedih, dan mengeluh?!

Allah SWT berfirman dalam Al-Quran Surat Fushilat ayat yang ke 30-31 :

"Sesungguhnya orang-orang yang mengatakan: "Tuhan kami ialah Allah" kemudian mereka meneguhkan pendirian (Istiqomah) mereka, maka malaikat akan turun kepada mereka (dengan mengatakan): "Janganlah kamu merasa takut dan janganlah kamu merasa sedih; dan bergembiralah kamu dengan (memperoleh) surga yang telah dijanjikan Allah kepadamu". Kamilah Pelindung-pelindungmu dalam kehidupan dunia dan di akhirat; di dalamnya kamu memperoleh apa yang kamu inginkan dan memperoleh (pula) di dalamnya apa yang kamu minta".

HALAMAN PERSEMBAHAN

Skripsi ini kupersembahkan kepada:

Kedua orang tuaku, Buaya Hazril Kamarudin dan Ibunda Marnis yang tercinta, terima kasih tak ternilai atas segala dukungan materil, moril, dan do'a serta kesabaran, yang subhanallah... luar biasa. Semoga Allah SWT senantiasa mencurahkan rahmat dan karuniaNya baik di dunia maupun diakhirat.

Kakakku tercinta Nur Rahmah Fauziah yang selalu dekat di hati walaupun jauh di mata, semoga Allah SWT senantiasa memelihara nur (cahaya) kecantikn di hati, lisan, pendengaran, dan penglihatan uni, "Allahummaj'alna nurran...". Dan seluruh keluarga besar Ummi Zainab di Jakarta, Padang, serta keluarga di Pariaman yang turut memberikan dorongan dan dukungan, sehingga terselesaikannya skripsi ini.

Bapak Bambang Kuswandi dan Bapak Neran atas segala perhatian, saran, diskusi, serta kesabarannya selama membimbing saya, semoga Allah SWT memberikan ganjaran pahala yang besar di sisNya.

Partner kerjaku di lab. Analitik; Tris, Wayan, Ila, Rina, Rini, Erika, Ida, Naning, Lisa, Encik, Jujun, Vita, dan Yeni. Terima kasih atas bantuan dan diskusinya. Teman-teman kimia seluruhnya, terutama angkatan 99 dan 00 yang tidak bisa aku sebutkan satu persatu, semoga Allah SWT senantiasa memberikan hidayahNya kepada kita semua.

Ikhwan dan akhwat FMIPA mantan "punggawa" IONS (mas Cakyo, akh soni, dan akh Rati) serta seluruh generasi IONS yang senantiasa berusaha mengibarkan panji dakwah di FMIPA. We are never too late to start and we are never too late to learn!!

Seluruh mujahid jalanan, pengurus dan kader KAMMI daerah Jember, wa bil khusus mas Rudi, mas Ardi, akh Rama, akh Anam, akh Brilliant, akh Yudi dan akh Topo yang tak kenal henti berjuang menegakkan panji Allah, "nuwun pangapunten dateng sedoyo kelepatan ing kang sampun kulo tinda'aken". Jazakumullah khairan banget atas segala dorongannya hingga terselesaikannya skripsi ini ...Ya Muqallibal qulub, tsabit qulubana 'ala dakwatik.

Dan kepada seluruh mujahid dakwah dimanapun berada, mari kita ubah warna dunia ini dengan spektrum ilahi yang mebiaskan warna ketaqwaan, hingga tak ada lagi fitnah yang tersisa!

DEKLARASI

Skripsi ini berisi hasil kerja/penelitian mulai bulan Januari 2004 sampai dengan Januari 2005 di Laboratorium Kimia Analitik Fakultas MIPA Universitas Jember. Bersama ini saya menyatakan bahwa isi skripsi ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri kecuali jika disebutkan sumbernya dan skripsi ini belum pernah diajukan pada institusi lain.

Jember, Mei 2005

Fuad M Muhsin



ABSTRAK

IMMOBILISASI ASETILKOLINESTERASE DENGAN METODE SOL-GEL SEBAGAI BAHAN BIOSENSOR PESTISIDA ORGANOFOSFAT DAN KARBAMAT.

Fuad M Muhsin, NIM 991810301088, Skripsi, Juli 2005, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember

Immobilisasi Asetilkolinesterase dengan metode sol-gel sebagai bahan biosensor pestisida organofosfat dan karbamat telah berhasil dilakukan. Biosensor berbasis asetilkolinesterase immobil ini dirangkaikan dengan indikator *brom thymol blue* (BTB) sebagai transduser optik. Proses pensensoran didasarkan dengan adanya inhibisi asetilkolinesterase oleh pestisida organofosfat dan karbamat sebagai analit, penurunan pH dari proses enzimatik diukur pada panjang gelombang 590 nm untuk BTB immobil dan 620 nm untuk BTB cair, dengan konsentrasi substrat 50 mM, waktu respon substrat 10 menit, dan waktu inhibisi selama 8 menit. Biosensor untuk penentuan pestisida menunjukkan respon linear pada range konsentrasi 50 – 1000 ppb untuk dimetoat dan 5 – 100 untuk propuksur. Limit deteksi biosensor yang dihasilkan untuk dimetoat adalah 10,677 ppb, sedangkan untuk propuksur adalah 3,547 ppb.

Kata kunci: *biosensor, immobilisasi, asetilkolinesterase, indikator brom thymol blue (BTB), dan pestisida*

ABSTRACT

IMMOBILIZATION OF ACETYLCHOLINESTERASE BY SOL-GEL METHODS AS BIOSENSOR AGENT ON ORGANOPHOSPHATE AND CARBAMAT PESTICIDE

Fuad M Muhsin, NIM 991810301088, Juli 2005, Chemistry departement, Faculty of Sciences, University of Jember

Immobilization of acetylcholinesterase by sol-gel methods as biosensor agent on organophosphate and carbamat pesticide had successfully been undertaken. This biosensor used brom thymol blue (BTB) indicator as optical transducer. The process of sensing was based on presence of acetylcholinesterase inhibition reaction by organophosphate and carbamat pesticide as analyte. The enzymatic reaction produce decreasing on pH level was measured on 590 nm wavelength for immobile BTB and 620 nm wavelength for liquid BTB in the substrat concentration of 50 nM, time estimation for substrats response was 10 minutes, inhibiting time was 8 minutes. Biosensor for pesticide identification showed the linear respon was range of concentration 50 – 1000 ppb for dimetoat and of 5 – 100 ppb for propuksur. The detection limitation of biosensor resulted was 10,677 ppb for dimetoat and 3,547 ppb for propuksur.

Keyword: *biosensor, immobilization, acetylcholinesterase, brom thymol blue indicator, and pesticide*

Skripsi ini diterima oleh Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember, pada:

Hari : **KAMIS**

Tanggal : **07 JUL 2005**

Tempat : Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Tim Penguji

Ketua

(Dosen Pembimbing Utama)



Drs. Bambang Kuswandi, M.Sc., Ph.D

NIP. 132. 094 129

Sekretaris

(Dosen Pembimbing Anggota)



Ir. Neran M.Kes

NIP. 130 521 900

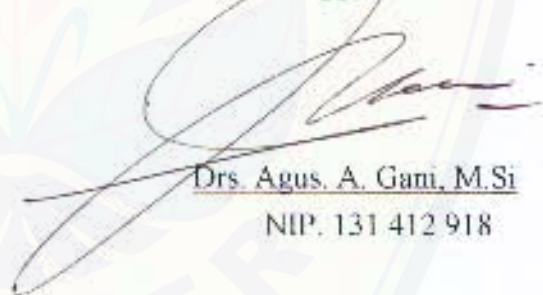
Anggota I



drh. Wuryanti Handayani, M.Si

NIP. 131 459 744

Anggota II



Drs. Agus. A. Gani, M.Si

NIP. 131 412 918

Mengesahkan

Dekan FMIPA Universitas Jember



Ir. Samadi, MS

NIP. 130 368 784

KATA PENGANTAR

Segala puji hanya untuk Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayahNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Shalawat serta salam senantiasa tercurah kepada baginda Nabi Muhammad SAW yang telah membawa pencerahan kepada umat manusia.

Skripsi ini disusun guna memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan program sarjana sains Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan alam Universitas Jember.

Penulis menyampaikan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada:

1. Dekan Fakultas MIPA Universitas Jember,
2. Ketua Jurusan Kimia Fakultas MIPA yang telah memberikan ijin penelitian selama penyelesaian skripsi ini,
3. Dosen Pembimbing Utama, Drs Bambang Kuswandi, MSc, PhD dan Dosen Pembimbing Anggota, Ir. Neran. MKes yang dengan penuh kesabaran telah membimbing penulis, mulai dari penentuan topik, pelaksanaan penelitian sampai tersusunnya skripsi ini,
4. Tim Penguji yang telah memberikan kritik dan saran dalam perbaikan skripsi ini,
5. Seluruh staf Dosen dan Administrasi serta teknisi di Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Jember
6. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian skripsi ini.

Akhirnya penulis berharap semoga skripsi ini memberikan kontribusi yang berarti terhadap kemajuan Ilmu Pengetahuan, khususnya di bidang Ilmu Kimia. Wallahu'alam bis showab.

Jember, Mei 2005

Penulis,



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN MOTTO	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN DEKLARASI	iv
HALAMAN ABSTRAK	v
HALAMAN PENGESAHAN	vii
HALAMAN KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Batasan Masalah	3
1.5 Manfaat Penelitian	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Biosensor	5
2.1.1 Prinsip Pengukuran Biosensor	5
2.1.2 Komponen Penyusun Biosensor	5
2.1.3 Penggunaan Biosensor	7

2.2 Enzim	7
2.2.1 Tinjauan Umum Tentang Enzim	7
2.2.2 Karakteristik Enzim Asetilkolinesterase	9
2.2.3 Mekanisme Reaksi Katalitik Asetilkolinesterase	9
2.2.4 Inhibisi Enzim	11
a. Inhibisi Reversibel	11
b. Inhibisi Irreversibel	13
2.3 Immobilisasi enzim	13
2.3.1 Tujuan Immobilisasi Enzim	13
2.3.2 Metode Immobilisasi Enzim	13
2.3.3 Teknik Sol-gel	14
2.3.4 Preparasi Sol-gel Berbasis Silika Gel	14
2.4 Pestisida	16
2.4.1 Peranan Pestisida	16
2.4.2 Insektisida Organofosfat	17
2.4.3 Insektida Karbamat	17
2.4.4 Reaksi Inhibisi Insektisida Organofosfat dan Karbamat terhadap Asetilkolinesterase	18
2.5 Transduser Optik	18
2.5.1 Sistem Instrumentasi	18
2.5.2 Prinsip Kerja Transduser Optik	19
2.5.3 Biosensor Berbasis Serat Optik	19
2.5.4 Transduser pH	19
2.6 Pengukuran Analitik Melalui Spektrofotometri UV-Vis	20
2.6.1 Hukum Lambert – Beer	22
2.6.2 Penyimpangan Hukum Beer	24

2.7 Indikator Asam – Basa	24
III METODE PENELITIAN	26
3.1 Rancangan Penelitian	26
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	27
3.3 Alat dan Bahan	27
3.3.1 Alat	27
3.3.2 Bahan	27
3.4 Langkah Kerja Penelitian	28
3.4.1 Preparasi Bahan	28
a. Pembuatan Larutan Buffer	28
b. Pembuatan Larutan Asetilkolin	28
c. Pembuatan Larutan Hidroksilamin Hidroklorida	28
d. Pembuatan Larutan standar Dimetoat	28
e. Pembuatan Larutan Standar Propuksur	29
f. Pembuatan Larutan Indikator Brom Thymol Blue cair	29
3.4.2 Teknik Immobilisasi	29
a. Immobilisasi Asetilkolinesterase dengan Teknik Sol-Gel	29
b. Immobilisasi Indikator Brom Thymol Blue dengan Teknik Sol-Gel	30
3.4.3 Desain Alat dan Prosedur Pengukuran Biosensor Pestisida Berdasarkan Asetilkolinesterase Immobil	30
3.4.4 Optimasi Parameter	31
a. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Brom Tymol Blue	31
b. Penentuan Konsentrasi Substrat Optimum	31

c. Pengukuran Waktu Respon Substrat	32
d. Penentuan Waktu Inhibisi Optimum	32
3.4.5 Reaktivasi Asetilkolinesterase	32
3.5 Karakteristik Metrologis Biosensor Serat Optik	32
3.5.1 Penentuan Linear Range	32
3.5.2 Limit Deteksi	33
3.5.3 Reprodusibilitas	33
IV HASIL DAN PEMBAHASAN	35
4.1 Immobilisasi Asetilkolinesterase dan Indikator BTB dengan Teknik Sol-Gel	35
4.2 Parameter Optimum Biosensor dalam Mendeteksi Pestisida	37
4.2.1 Panjang Gelombang Maksimum	37
4.2.2 Konsentrasi Substrat Optimum	39
4.2.3 Waktu Respon Substrat	40
4.2.4 Waktu Inhibisi Pestisida	41
4.3 Karakteristik Biosensor Pestisida	42
4.3.1 Linear Range	42
4.3.2 Limit Deteksi	45
4.3.3 Reprodusibilitas	45
4.4 Reaktivasi Biosensor Asetilkolinesterase Immobil	45
4.5 Pengukuran Sampel Simulasi	47
V KESIMPULAN DAN SARAN	49
5.1 Kesimpulan	49
5.2 Saran	49

DAFTAR PUSTAKA 50

LAMPIRAN



DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Prinsip Pengukuran Biosensor	7
Gambar 2.	Mekanisme Reaksi Katalitik Asetilkolinesterase	10
Gambar 3.	Proses Pembuatan Gelas Silikat Melalui Proses Sol-Gel dengan Menggunakan Prekursor Tetrametil Ortosilikat	15
Gambar 4.	Struktur Dietil-4-Nitrofenol Fosfat (Paraoxon)	17
Gambar 5.	Struktur O-Isopropoksifenil Metilkarbamat (baygon)	17
Gambar 6.	Reaksi Inhibisi (a) Organofosfat dan (b) Karbamat terhadap Asetilkolinesterase	18
Gambar 7.	Hukum Lambert – Beer	22
Gambar 8.	Bentuk Disosiasi dari Struktur Indikator Brom Thymol Blue	25
Gambar 9.	Rancangan Penelitian	26
Gambar 10.	Desain Alat Biosensor Serat Optik Pestisida Berbasis Asetilkolinesterase dan Brom Thymol Blue Immobil	31
Gambar 11.	Foto Hasil Immobilisasi (a) Asetilkolinesterase dan (b) Indikator Brom Thymol Blue	35
Gambar 12.	Perubahan Warna Indikator Brom Thymol Blue Sebelum dan Sesudah Hidrolisis	36
Gambar 13.	Kurva Kecepatan Reaksi Enzimatis Asetilkolinesterase dalam Keadaan Cair dan Terimmobilisasi terhadap Substrat Asetilkolin pada Waktu Rata-rata $t = 5$ menit	37
Gambar 14.	Kurva Scanning Panjang Gelombang Maksimum Indikator BTB Immobil; dengan Blank (Buffer Tris pH=7,5) dan Analit (Asetilkolin 50 mM)	38
Gambar 15.	Kurva Scanning Panjang Gelombang Maksimum Indikator BTB Cair; dengan Blank (Buffer Tris pH=7,5) dan Analit (Asetilkolin 50 mM)	38

Gambar 16. Kurva Hubungan Antara Variasi Konsentrasi Asetilkolin dengan Respon Sensor Asetilkolinesterase Immobil	40
Gambar 17. Kurva Respon Asetilkolin terhadap Asetilkolinesterase Immobil Selama Selang Waktu Tertentu	41
Gambar 18. Kurva Respon Asetilkolinesterase Immobil terhadap Variasi Waktu Inhibisi Pestisida	42
Gambar 19. Kurva Respon Biosensor Asetilkolinesterase yang Terinhibisi oleh Variasi Konsentrasi Dimetoat (rata-rata tiga kali pengulangan)	43
Gambar 20. Kurva Respon Biosensor Asetilkolinesterase yang Terinhibisi oleh Variasi Konsentrasi Propuksur (rata-rata tiga kali pengulangan)	43
Gambar 21. Kurva Kalibrasi untuk Pestisida Dimetoat	44
Gambar 22. Kurva Kalibrasi untuk Pestisida Propuksur	44

DAFTAR TABEL

Tabel 1.	Klasifikasi Komponen Biologi Penyusun Biosensor	6
Tabel 2.	Daerah Panjang Gelombang UV – Vis	21
Tabel 3.	Beberapa Jenis Indikator Asam-Basa	24
Tabel 4.	Kecepatan Reaksi Enzimatik Asetilkolinesterase terhadap Asetilkolin pada Waktu rata-rata $t = 5$ menit	36
Tabel 5.	Penentuan Konsentrasi Asetilkolin Optimum terhadap Reaksi Enzimatik Asetilkolinesterase Immobil	39
Tabel 6.	Respon Biosensor Asetilkolinesterase Immobil terhadap Sampel Simulasi Pestisida Dimetoat	47
Tabel 7.	Respon Biosensor Asetilkolinesterase Immobil terhadap Sampel Simulasi Pestisida Propuksur	47
Tabel 8.	Kesalahan Respon Biosensor terhadap Sampel Simulasi	47

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Data Perbandingan Aktivitas Enzim Asetilkolinesterase Bebas dan Immobil	53
Lampiran 2. Data Scanning Panjang Gelombang Indikator Brom Thymol Blue Immobil	54
Lampiran 3. Data Scanning Panjang Gelombang Indikator Brom Thymol Blue Cair	56
Lampiran 4. Data Waktu Respon Substrat Asetilkolin terhadap Enzim Asetilkolinesterase Immobil	57
Lampiran 5. Data Penentuan Waktu Inhibisi Optimum	58
Lampiran 6. Data Respon Biosensor Asetilkolinesterase Immobil yang Terinhibisi oleh Pestisida Dimetoat dengan Variasi Konsentrasi 10 – 2000 ppb	59
Lampiran 7. Data Respon Biosensor Asetilkolinesterase terhadap Pestisida Dimetoat (rata-rata tiga kali ulangan)	60
Lampiran 8. Data Respon Biosensor Asetilkolinesterase Immobil yang Terinhibisi oleh Pestisida Propuksur dengan Variasi Konsentrasi 5 – 250 ppb	61
Lampiran 9. Data Respon Biosensor Asetilkolinesterase terhadap Pestisida Propuksur (rata-rata tiga kali ulangan)	62
Lampiran 10. Perhitungan Limit Deteksi	63
Lampiran 11. Perhitungan Reprodusibilitas	66
Lampiran 12. Perhitungan Penentuan Sampel	70

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kemajuan teknologi biosensor meningkat sejalan dengan kebutuhan manusia dalam berbagai bidang, baik dalam bidang medis (diagnosis klinik dan biomedis), mikrobiologi (analisis bakteri dan virus), pengolahan makanan, maupun dalam bidang pertanian, perkebunan dan monitoring lingkungan. Keberadaan biosensor dalam bidang pertanian sangat diperlukan, terutama untuk mendeteksi residu pestisida dari hasil pertanian. Menurut Isvasta (1998), pestisida yang digunakan untuk mengendalikan hama tanaman di bidang pertanian ini menjadi dilema yang harus dicermati. Di satu sisi penggunaan pestisida dikatakan urgen dalam membantu meningkatkan produksi hasil pertanian, namun di sisi lain pemakaian pestisida dapat menimbulkan tragedi pencemaran lingkungan yang cukup serius. Bahaya pestisida yang utama yaitu keracunan, kebakaran, dan pencemaran lingkungan hidup.

Salah satu contoh jenis pestisida yang dapat menimbulkan dampak negatif, baik terhadap manusia maupun lingkungan adalah insektisida. Jenis pestisida ini telah banyak beredar di masyarakat. Menurut data pencatatan dari Badan Proteksi Lingkungan Amerika Serikat, lebih dari 26.000 jenis bahan aktif pestisida telah beredar dipasaran. Bahan aktif tersebut sebanyak 575 jenis diantaranya berupa herbisida, 610 jenis berupa insektisida, 570 jenis berupa fungisida dan nemasida, 125 jenis berupa rodensida dan sebanyak 600 jenis berupa disinfektan (Sudarmo, 1991). Jenis insektisida organik sintetik yang sering digunakan dalam bidang pertanian dan rumah tangga adalah organofosfat dan karbamat. Keduanya menunjukkan persistensi yang rendah di alam sekitar (lingkungan) serta bersifat toksik akut yang tinggi dalam tubuh hewan dan manusia melalui inhibisi aktivitas asetilkolinesterase, yang dapat mengubah metabolisme asetilkolin dalam sistem syaraf (Azis, 2002). Dengan demikian, perlu dikembangkan suatu perangkat analitik yang mampu mengenali keberadaan pestisida organofosfat dan karbamat di lingkungan secara dini.

Roberto. T. Andres dan Ramaier Narayanaswamy (1997) telah mengembangkan biosensor pestisida yang didasarkan pada teknik immobilisasi asetilkolinesterase dan indikator *thymol blue* secara ikatan kovalen. Pada sensor ini asetilkolinesterase dan indikator *thymol blue* diletakkan dalam satu sel yang sama. Ketika larutan asetilkolin dialirkan dengan sistem *flow*, asetilkolin akan terhidrolisis oleh asetilkolinesterase membentuk asam asetat dan kolin. Asam asetat yang terbentuk dapat diukur dengan indikator *thymol blue*. Adanya penambahan pestisida (organofosfat dan karbamat) mengakibatkan aktivitas asetilkolinesterase akan terhambat, sehingga berpengaruh terhadap jumlah produk asam asetat dan kolin yang dihasilkan. Pengukuran inhibisi enzim asetilkolinesterase ini dilakukan dengan menggunakan transduser optik.

Menurut Dave *et al.* (1994) selain immobilisasi enzim yang dilakukan dengan menggunakan metode ikatan kovalen, terdapat teknik immobilisasi lain dalam biosensor yang dapat digunakan yaitu adsorpsi, *crosslinking*, dan entrapmen. Penelitian ini akan melakukan optimasi preparasi asetilkolinesterase immobil dengan menggunakan metode entrapmen melalui penjebakan asetilkolinesterase ke dalam matriks sol-gel SiO_2 setelah dipreparasi dari Tetra Metil Orthosilikat (TMOS) sebagai elemen biosensor pestisida. Pemilihan TMOS sebagai prekursor dalam pembentukan matrik silikat SiO_2 disebabkan karena prekursor ini memiliki logam atau metaloid yang dikelilingi oleh berbagai ligan reaktif. Logam alkoksida merupakan logam paling populer yang digunakan sebagai bahan dasar sol-gel, karena logam alkoksida tersebut dapat bereaksi langsung dengan air. Logam alkoksida seperti TMOS, merupakan logam yang paling banyak digunakan. Pengamatan terhadap asetilkolinesterase immobil meliputi karakter biokimiawi dari kondisi optimum aktivitas enzim dibandingkan dengan enzim bebas.

1.2 Perumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

- 1) dapatkah proses immobilisasi enzim asetilkolinesterase dan indikator *brom thymol blue* (BTB) dilakukan dengan teknik sol-gel, sehingga mampu digunakan dalam penentuan pestisida organofosfat dan karbamat?
- 2) berapakah kondisi optimum (meliputi konsentrasi substrat, waktu respon substrat, dan waktu inhibisi optimum) penggunaan biosensor berbasis asetilkolinesterase yang terimmobilisasi secara sol-gel dalam penentuan pestisida organofosfat dan karbamat?
- 3) berapakah nilai karakteristik metrologis (meliputi linear range, limit deteksi, dan reproduibilitas) biosensor berbasis asetilkolinesterase yang terimmobilisasi secara sol-gel dalam penentuan pestisida organofosfat dan karbamat?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah:

- 1) mendapatkan enzim asetilkolinesterase dan indikator *brom thymol blue* immobil, yang mampu digunakan dalam penentuan pestisida organofosfat dan karbamat,
- 2) memperoleh kondisi optimum (meliputi konsentrasi substrat, waktu respon substrat, dan waktu inhibisi optimum) pada penggunaan biosensor berbasis asetilkolinesterase yang terimmobilisasi secara sol-gel dalam penentuan pestisida organofosfat dan karbamat,
- 3) memperoleh nilai karakteristik metrologis (meliputi linear range, limit deteksi, dan reproduibilitas) biosensor berbasis asetilkolinesterase yang terimmobilisasi secara sol-gel dalam penentuan pestisida organofosfat dan karbamat

1.4 Batasan Masalah

Penentuan konsentrasi substrat optimum pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan *ocean optic spectrometri*, dengan indikator *Brom Thymol*

Blue (BTB) immobil sebagai transduser optik. Sedangkan pada penentuan waktu respon substrat optimum, waktu inhibisi optimum, kurva kalibrasi pestisida, serta sampel pestisida dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis (indikator BTB cair). Hal ini dilakukan, disebabkan karena larutan Tetra Metil Orto Silikat (TMOS) yang dibutuhkan sebagai prekursor matrik silikat SiO_2 pada pembentukan sol-gel untuk membentuk indikator BTB immobil tidak tersedia akibat alasan teknis.

1.5 Manfaat Penelitian

Pengembangan biosensor berbasis enzim asetilkolinesterase immobil ini diharapkan mampu mendeteksi lebih dini keberadaan pestisida yang mencemari lingkungan, terutama jenis insektisida organofosfat dan karbamat yang sering digunakan dalam bidang pertanian dan kehidupan rumah tangga, sehingga kita dapat mengetahui kondisi lingkungan yang tercemar dan dapat dicarikan solusinya. Selain itu, penelitian ini juga diharapkan akan menghasilkan sensor pestisida yang relatif lebih murah dan memiliki sensitivitas serta selektivitas yang tinggi. Hal ini disebabkan karena enzim yang terimmobilisasi dapat digunakan kembali untuk pengukuran.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biosensor

2.1.1 Prinsip Pengukuran Biosensor

Biosensor merupakan suatu perangkat analitik yang menggunakan biomolekul (molekul yang berasal dari makhluk hidup) seperti enzim, antibodi, jaringan, sel, mikroorganisme, dan DNA untuk melakukan pengenalan/ deteksi/ rekognisi akan suatu zat (bio)kimia tertentu. Informasi dari perubahan sifat fisika-kimia pada biomolekul itu ditransmisikan dengan transduser fisis menjadi besaran elektronik untuk bisa diolah selanjutnya (Hermawan, 2000).

Biosensor berkembang dari sebuah pemikiran kerja organ tubuh manusia, seperti telinga, hidung, ataupun mata. Indra manusia menangkap sinyal dari luar dan memproses secara fotokimia atau secara elektrokimia. Sinyal yang dihasilkan selanjutnya diteruskan ke dalam otak dan diproses serta diaktualisasikan ke dalam satuan kualitas ataupun kuantitas (Eggins, 1996).

2.1.2 Komponen Penyusun Biosensor

Biosensor terdiri dari dua komponen dasar yang utama, yaitu komponen biologi dan transduser. Interaksi spesifik antara analit dengan komponen biologi (biomolekul) akan menghasilkan perubahan sifat fisika-kimia yang dapat terdeteksi dan terukur oleh transduser.

Komponen biologi yang digunakan berfungsi untuk mengenali dan mengikat analit secara spesifik. Sifat dari komponen biologi ini memberikan kespesifikan pada biosensor dan menjadikannya sesuai dalam menganalisis sampel tanpa adanya *pretreatment* (uji pendahuluan). Komponen biologi yang umum digunakan ada dua kategori, yaitu biokatalis dan bioreseptor. Klasifikasi kedua komponen tersebut ditunjukkan pada tabel 1.

Pada biokatalis, interaksi antara komponen biologi dengan substrat diikuti dengan reaksi kimia untuk menghasilkan produk. Komponen biokatalis yang umum digunakan pada biosensor adalah enzim, meskipun pada komponen lain

juga terdapat enzim didalamnya, termasuk sel, jaringan dan mikroorganisme (Eggins, 1996).

Tabel 1. Klasifikasi Komponen Biologi Penyusun Biosensor

Komponen	Contoh
Biokatalis	Enzim Mikrobiologi, sel tumbuhan dan hewan Sub organel-organel sel
Bioreseptor	Antibodi Sel membran reseptor Asam nukleat Molekul sintetik

Sumber: Holme dan Hazel, 1998

Penggunaan enzim sebagai elemen biosensor memiliki beberapa kelebihan dibandingkan dengan komponen biologi lain, diantaranya yaitu:

- reaksi langsung mengikat substrat yang ingin dijadikan sampel,
- memiliki selektifitas yang tinggi,
- aktivitas katalitiknya dapat meningkatkan sensitifitas sensor,
- reaksi umumnya berlangsung cepat,
- merupakan zat yang paling umum digunakan sebagai bioaktif molekul dalam biosensor.

Namun demikian, beberapa kelemahan yang terdapat didalamnya adalah:

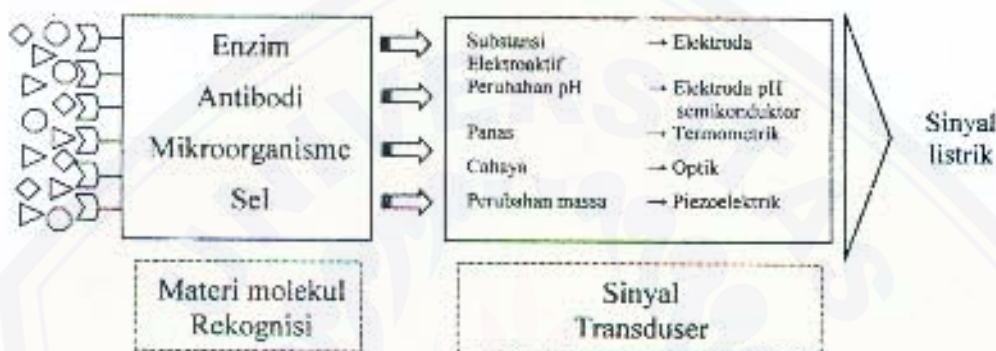
- biasanya sangat mahal, hal ini terkait dengan proses pemisahan enzim yang sangat sulit dan lama,
- sering terjadi kerusakan (kehilangan aktivitas katalitik) pada saat diimmobilisasi pada transduser,
- sering terjadi deaktivasi sisi aktif molekul dalam waktu yang relatif singkat.

Pada biosensor, suatu transduser dimanfaatkan untuk mengkonversi perubahan (fisika atau kimia) yang teramati ke dalam sinyal yang dapat diukur. Biasanya

sinyal elektronik yang terukur besarnya sebanding dengan konsentrasi spesi kimia tertentu (Eggins, 1996).

Transduser yang digunakan dapat berbagai jenis, tergantung pada parameter yang diukur. Transduser tersebut dapat berupa elektrokimia, optik, piezoelektrik ataupun termometrik (<http://www.jaist.ac.jp/yokoyama/biosensor>).

Prinsip pengukuran biosensor yang melibatkan kedua komponen (komponen biologi dan transduser) diatas, ditunjukkan pada gambar berikut:



Gambar 1. Prinsip Pengukuran Biosensor

2.1.3 Penggunaan Biosensor

Penggunaan biosensor sudah berkembang sangat luas, diantaranya meliputi bidang kesehatan (dalam diagnosis klinik dan biomedis), bidang pertanian, perkebunan dan kedokteran hewan, industri (yang berbasis fermentasi), pengolahan makanan, mikrobiologi (analisis bakteri dan virus), kontrol dan monitoring lingkungan, fermentasi, militer, dan pertambangan.

2.2 Enzim

2.2.1 Tinjauan Umum Tentang Enzim

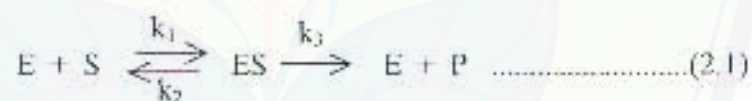
Enzim merupakan suatu molekul protein yang efektif dalam mengkatalisis berbagai reaksi kimia dalam sistem biologi. Sebagaimana protein lain, enzim mempunyai berat molekul yang berkisar antara 12.000 sampai dengan lebih dari satu juta. Oleh karena itu, enzim berukuran jauh lebih besar jika dibandingkan

dengan substrat (reaktan yang dapat menghasilkan produk dalam reaksi enzimatik) atau gugus fungsional targetnya (Lehninger, 1997).

Sifat enzim yang paling mencolok adalah daya katalitik dan spesifitasnya. Enzim memiliki daya katalitik yang luar biasa, yang biasanya jauh lebih besar daripada katalisator sintetik. Aktifitas katalitik enzim bergantung pada integritas strukturnya sebagai protein. Penurunan aktivitas katalitik enzim akan terjadi karena pengaruh temperatur dan pH yang menyimpang jauh dari keadaan normal, atau akibat dari perlakuan dengan senyawa lain (Strayer, 2000). Pada hakekatnya enzim mempercepat reaksi kimia spesifik dengan cara mempercepat tercapainya keadaan setimbang dan sama sekali tidak mengubah kesetimbangan.

Enzim sangat spesifik, baik terhadap reaksi yang dikatalisisnya, maupun terhadap substratnya. Suatu enzim biasanya mengkatalisis satu reaksi kimia saja atau reaksi yang sejenisnya. Dalam reaksi enzimatik, tidak terjadi reaksi samping yang menyebabkan terbentuknya hasil samping yang tidak dibutuhkan. Hal ini berbeda dengan reaksi non-enzimatik.

Menurut Leonor Michaelis dan Maud Menten (1913) dalam Strayer (2000), mekanisme dasar katalitik enzim adalah:



Suatu enzim E berikatan dengan substrat S membentuk kompleks ES dengan tetapan k_1 . Kompleks ES mempunyai dua kemungkinan, kompleks ini dapat terurai kembali menjadi E + S dengan suatu tetapan kecepatan k_2 , atau melanjutkan reaksi untuk membentuk produk P dengan tetapan kecepatan k_3 . Berdasarkan penelitian yang telah dilakukannya, diperoleh persamaan Micaelis Menten:

$$V = V_{maks} \frac{[S]}{[S] + K_M} \dots\dots\dots(2.2)$$

Tetapan Michaelis, K_M dan kecepatan maksimum, V_{maks} , dapat ditentukan dengan cara mengukur langsung kecepatan katalisis pada berbagai konsentrasi

substrat, bila suatu enzim sesuai dengan persamaan reaksi 1. Kedua tetapan ini lebih mudah lagi dihitung dengan mengubah persamaan Michaelis-Menten menjadi suatu persamaan garis lurus. Perubahan ini diperoleh dengan membalikkan kedua ruas dari persamaan 15 sehingga diperoleh persamaan Lineweaver Burk:

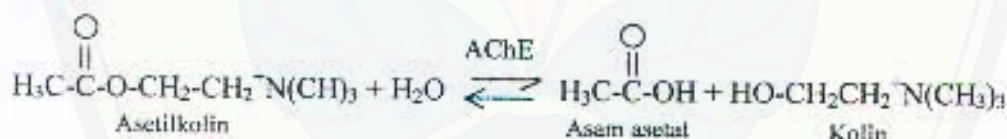
$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} \dots\dots\dots(2.3)$$

(Strayer, 2000)

2.2.2 Karakteristik Enzim Asetilkolinesterase

Asetilkolinesterase merupakan kelompok enzim hidrolase, yang secara fisiologi ditemukan dalam sel darah merah (eritrosit), otot rangka, paru-paru, limpa, dan otak kecerdasan (*gray matter*) pada jaringan syaraf. Secara biologi, asetilkolinesterase berperan dalam penghentian transmisi impuls syaraf melalui katalisis reaksi hidrolisis secara cepat senyawa asetilkolin (biomolekul yang berperan penting dalam gerak transmisi impuls syaraf pada *peripheral* dan pusat sistem syaraf) pada neurotransmitter (Schumacher, *et al.*, 1986).

Reaksi hidrolisis asetilkolin oleh enzim asetilkolinesterase (AChE) akan menghasilkan asam asetat dan kolin:

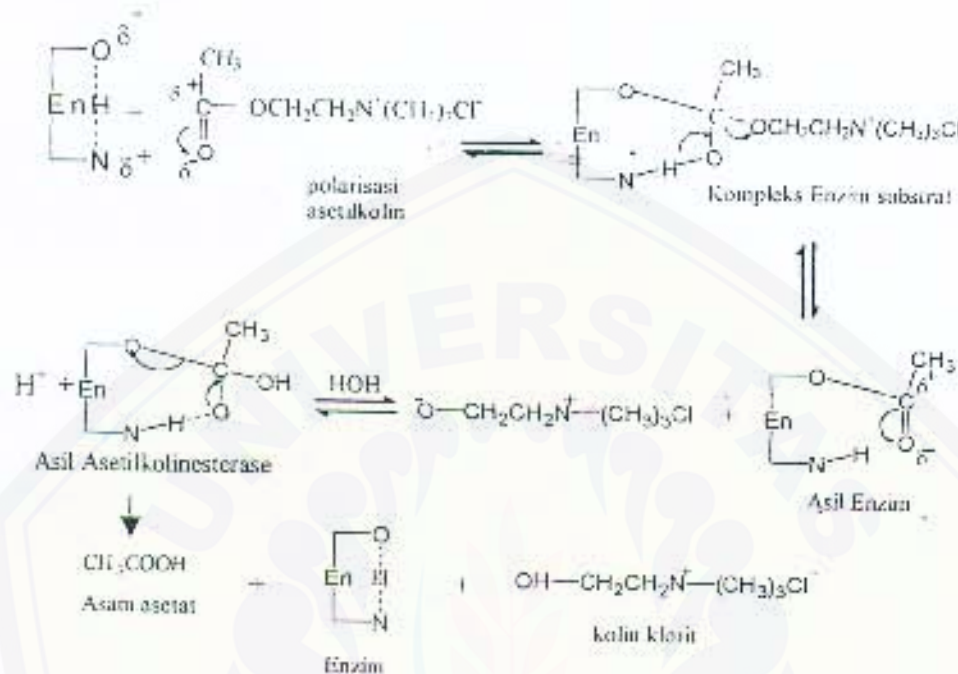


Asetilkolinesterase merupakan enzim yang sangat cepat dalam menghidrolisis substratnya; dalam satu molekul enzim, mampu untuk menghidrolisis sebanyak 14.000 molekul asetilkolin dalam satu detik ($k_{cat} = 1,4 \times 10^4 \text{ det}^{-1}$). Enzim ini memiliki konstanta Michaelis Menten, K_M sebesar $9 \times 10^5 \text{ M}$, sehingga harga k_{cat}/K_M adalah $1,6 \times 10^8 \text{ det}^{-1}\text{M}^{-1}$ (Zubay, 1989).

2.2.3 Mekanisme Reaksi Katalitik Asetilkolinesterase

Cunningham dalam West dan Todd (1961) telah menunjukkan mekanisme enzim hidrolitik berdasarkan data dan fakta yang ada. Ia menyampaikan bahwa

pembentukan pusat aktif menyebabkan terbentuknya ikatan hidrogen antara serin-OH dan inti imidazol yang berdekatan (histidin). Polarisasi dari struktur yang terjadi ditunjukkan pada gambar 2.



Gambar 2. Mekanisme Reaksi Katalitik Asetilkolinesterase

Bagian parsial negatif (δ^-) dari oksigen dan bagian parsial positif (δ^+) dari nitrogen imidazol menyebabkan oksigen serin menjadi agen nukleofilik yang akan menyerang karbonil dari substrat. Agen nukleofilik merupakan donor elektron, parsial negatif oksigen bereaksi dengan parsial positif karbon dari karbonil substrat. Menurut teori, stabilisasi dari struktur menyebabkan perubahan ikatan hidrogen dari serin terhadap karbonil oksigen dari substrat seperti yang diindikasikan dalam kompleks enzim substrat. Asil intermediet dituliskan dengan proton dalam nitrogen imidazol. Sebagaimana proses deasilasi yang terjadi, muatan positif ini akan hilang secara bersamaan dengan serangan reagen nukleofilik HOH pada reaksi hidrolisis secara keseluruhan. Pada akhirnya akan terbentuk etilat, dan sebagaimana proses deasilasi enzim yang terjadi, terbentuk asam asetat, H^+ dibebaskan dari air, dan akan bereaksi dengan etilat untuk

membentuk kolin. Pusat aktif enzim kemudian terbentuk kembali dan dapat digunakan untuk proses reaksi selanjutnya (West and Todd, 1961).

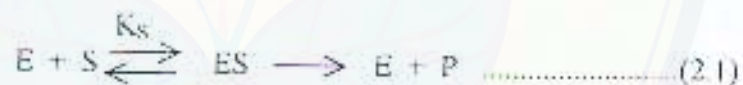
2.2.4 Inhibisi Enzim

Proses penurunan aktivitas enzimatik melalui pengikatan suatu molekul substrat terhadap situs aktif enzim disebut sebagai inhibisi terhadap enzim. Inhibisi enzim yang terjadi dapat berupa inhibisi reversibel atau inhibisi irreversibel.

a. Inhibisi Reversibel

Pada inhibisi reversibel terjadi proses pembentukan ikatan nonkovalen, sehingga dapat kembali seperti semula secara cepat melalui penghilangan inhibitornya. Inhibisi reversibel bekerja dengan mekanisme berbeda-beda yang dapat dibedakan kedalam inhibisi kompetitif, inhibisi nonkompetitif dan inhibisi unkompetitif.

Dalam inhibisi kompetitif, pengikatan inhibitor dan substrat terhadap enzim saling berkompetisi antara satu dengan yang lain. Reaksi yang terjadi pada keadaan ini adalah:



Hal yang sama juga terjadi bagi pembentukan kompleks enzim inhibitor, sebagaimana pada pembentukan kompleks enzim substrat, yaitu:



dimana I adalah inhibitor, EI merupakan kompleks enzim inhibitor dan K_i adalah konstanta disosiasi kompleks enzim inhibitor.

Dengan kehadiran inhibitor kompetitif, kecepatan reaksi katalis bergantung pada konsentrasi relatif dari substrat dan inhibitornya. Sehingga persamaan Lineweaver Burk pada persamaan 2.3, menjadi:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_M}{V_{max}} \left[1 + \frac{[I]}{K_I} \right] \frac{1}{[S]} \quad \dots\dots\dots(2.5)$$

Dimana [I] adalah konsentrasi inhibitor dan K_I adalah konstanta disosiasi kompleks enzim-inhibitor.

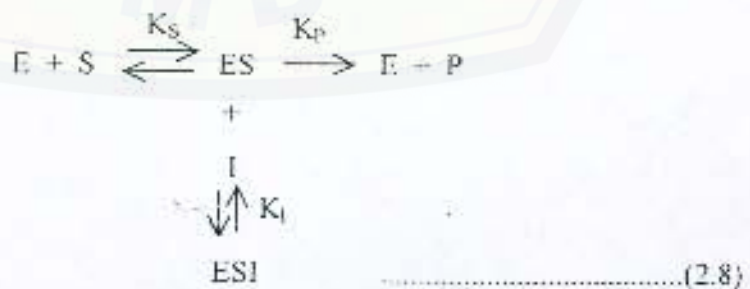
Inhibisi nonkompetitif terjadi karena inhibitor dapat terikat pada enzim bebas atau pada kompleks enzim substrat. Inhibitor ini tidak menghambat pengikatan substrat, tapi memperlambat atau menghentikan reaksi enzimatik melalui pengikatan terhadap kompleks enzim substrat, membentuk kompleks ESI.



Pada inhibisi nonkompetitif, jumlah substrat tidak dapat menghilangkan inhibisi. Hal ini berdasarkan fakta bahwa substrat dan inhibitor terikat pada masing-masing situs enzim, tidak terjadi *overlapping* situs. Persamaan Lineweaver Burk dalam keadaan ini adalah:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} \left[1 + \frac{[I]}{K_I} \right] + \frac{K_M}{V_{max}} \left[1 + \frac{[I]}{K_I} \right] \frac{1}{[S]} \quad \dots\dots\dots(2.7)$$

Inhibisi unkompetitif terjadi ketika inhibitor (I) hanya mampu mengikat kompleks enzim substrat (ES) namun tidak terhadap enzim bebas (E).



Persamaan Lineweaver Burknya adalah:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} \left[1 + \frac{[J]}{K_j} \right] + \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} \quad \dots\dots\dots(2.9)$$

(Zubay, 1989)

b. Inhibisi Irreversibel

Inhibisi irreversibel terjadi ketika inhibitor mengikat sangat kuat situs aktif molekul enzim, yang pada umumnya terbentuk ikatan kovalen. Pengikatan ini menyebabkan inaktifnya enzim secara permanen.

2.3 Immobilisasi Enzim

2.3.1 Tujuan Immobilisasi Enzim

Immobilisasi enzim merupakan suatu metode yang membatasi pergerakan molekul enzim secara fisik dalam ruang yang dikatalisisnya. Secara umum Immobilisasi enzim berguna untuk menjaga stabilitas keaktifan enzim, melindungi medium serta kondisi reaksi, mencegah kontaminasi terhadap bakteri, dan mencegah terjadinya degradasi enzim secara kimia (Dave *et al.*, 1994).

Pemakaian enzim dalam keadaan bebas (enzim terlarut dalam air) kurang menguntungkan. Hal ini disebabkan karena enzim hanya dapat digunakan untuk satu kali reaksi dan tidak dapat digunakan kembali setelah terpakai. Dengan penggunaan teknik immobilisasi enzim ini, enzim dapat dipakai secara berulang.

2.3.2 Metode Immobilisasi Enzim

Immobilisasi enzim dapat dilakukan dengan berbagai cara, antara lain melalui metode pemasukan enzim secara adsorpsi pada bahan pendukung padatan, pengikatan secara kimiawi molekul enzim pada bahan pendukung, pengikatan silang intermolekuler sesama enzim, atau dengan cara menjebak enzim ke dalam pori-pori gel atau membran polimer (Kuswandi, *et al.*, 2001).

Metode yang sering dilakukan dalam teknik immobilisasi enzim ini adalah metode entrapmen (penjebakan), yang sering disebut dengan metode sol-gel. Hal ini disebabkan karena pada metode ini enzim berada dalam keadaan bebas dan

tidak terikat pada bahan pendukung sehingga fungsi katalitiknya relatif lebih baik dibandingkan dengan teknik lainnya. Selain itu molekul enzim juga relatif sedikit mengalami gangguan (Kierstan dan Coughlan, 1985).

Dalam teknik ini enzim diperangkap ke dalam rongga-rongga membran atau matriks polimer, sehingga proses preparasi membutuhkan teknik yang sangat spesifik. Beberapa teknik yang telah dikembangkan, yaitu dengan cara mencampurkan larutan enzim dengan larutan monomer, selanjutnya dipolimerisasi sehingga membentuk gel. Bioaktif material terjerap pada polimer tersebut.

Membran polimer yang paling umum digunakan dalam teknik ini adalah bentuk gel poliakritamida, *starch gel*, dan *silastic gel*. Beberapa kelemahan dari teknik ini adalah munculnya material pengganggu yang dapat menginhibisi difusi terhadap substrat, yang menyebabkan reaksi berlangsung lambat, sehingga *response time* dan *recovery* sensor lambat. Selain itu dalam proses polimerisasi sangat mungkin enzim rusak atau terdegradasi sehingga kehilangan aktifitasnya. Kelemahan ini dapat diatasi dengan menambahkan *plastisiser* kedalamnya atau dengan cara membentuk ikatan antara enzim dengan membrannya melalui *crosslinking* maupun ikatan kovalen (Eggins, 1996).

2.3.3 Teknik Sol-gel

Proses sol-gel merupakan nama yang diberikan untuk suatu proses dimana larutan atau sol mengalami keadaan transisi sol-gel. Pada keadaan transisi ini larutan menjadi rigid, massa berpori. Sol merupakan partikel koloid terdispersi dalam larutan. Partikel koloid ini merupakan partikel padat yang memiliki diameter 1-100 nm. Sedangkan suatu gel merupakan jaringan rigid dengan memiliki dimensi pori submikrometer, yaitu kurang dari 10^{-4} nm (Bucley dan Greenblatt, 1994).

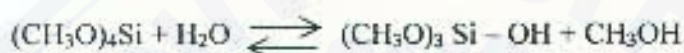
2.3.4 Preparasi Sol-gel berbasis silika gel

Pembentukan matrik silikat diperoleh dengan melakukan reaksi hidrolisis alkoksida, yang biasanya menggunakan prekursor Tetra Metil Ortosilikat

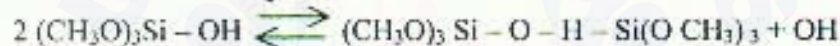
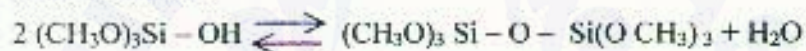
(TMOS), diikuti dengan reaksi kondensasi untuk menghasilkan jaringan polimer dengan jembatan oxo SiO_2 . Proses reaksi pembentukan matrik silikat ini dapat dilihat pada gambar 3.

Hasil hidrolisis pada konversi ikatan Si-OR menjadi ikatan Si-OH yang memadat membentuk struktur polimer dengan jembatan oxo Si-O-Si . Reaksi ini terjadi pada daerah yang terlokalisasi dan mengarah kepada pembentukan sol. Selama polikondensasi berlangsung, viskositas dari sol meningkat kemudian membentuk gel yang berpori. Material sol gel yang diperoleh merupakan cairan padat yang mengandung hingga 70% berat air (Dave *et al.*, 1994).

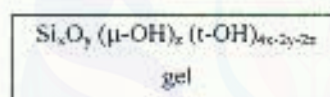
Reaksi Hidrolisis:



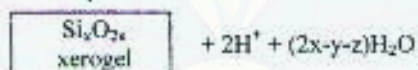
Reaksi Kondensasi:



↓ Pembentukan gel



↓ Aging and drying



Gambar 3. Proses Pembuatan Gelas Silikat Melalui Proses Sol-Gel dengan Menggunakan Prekursor Tetrametil Ortosilikat

Teknik sol-gel yang dilakukan secara konvensional pada umumnya membutuhkan pH dan konsentrasi alkohol yang ekstrim, dimana keduanya dapat mengganggu stabilitas biomolekul. Untuk mengatasi masalah ini, dapat dilakukan dengan penghilangan penambahan alkohol pada reaksi awal. Selain itu dapat juga dilakukan dengan penambahan buffer setelah proses hidrolisis yang dikatalis oleh asam ketika TMOS telah dihasilkan dan sebelum protein enzim ditambahkan pada medium reaksi (Ellerby *et al.*, 1992). Dengan adanya penambahan buffer, maka

pH larutan akan sesuai dengan pH protein enzim, sehingga mencegah terjadinya denaturasi atau agregasi dari protein enzim akibat kondensasi asam. Modifikasi metode sol-gel ini memungkinkan untuk mensintesis gelas anorganik pada temperatur yang lebih rendah, dapat menghasilkan zat padat yang transparan secara optik, serta stabil secara kimia, termal, dan dimensional (Dave *et al.*, 1994).

2.4 Pestisida

2.4.1 Peranan Pestisida

Kehadiran pestisida sebagai substansi kimia yang digunakan untuk membunuh dan mengendalikan berbagai hama tanaman pada industri pertanian mengundang dilema. Di satu sisi penggunaan pestisida dikatakan urgen dalam membantu meningkatkan produksi hasil pertanian. Namun disisi lain pemakaian pestisida menimbulkan tragedi pencemaran lingkungan yang cukup serius. Bahaya pestisida yang utama yaitu keracunan, kebakaran dan pencemaran lingkungan hidup. Keracunan dan kebakaran merupakan bahaya langsung bagi manusia yang bersifat individual dan insidental. Sedangkan bahaya pencemaran lingkungan hidup lebih bersifat sosial dan alamiah yang menyebabkan terganggunya ekosistem kehidupan (Isvasta, 1988).

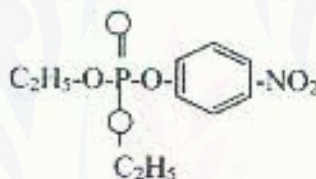
Menurut Simon (1984), jenis pestisida yang banyak beredar di masyarakat 80% diantaranya adalah insektisida (jenis pestisida yang berfungsi untuk membunuh serangga), dan 20% lainnya terdiri dari fungisida (jenis pestisida yang berfungsi untuk membunuh jamur), herbisida (jenis pestisida yang berfungsi untuk membunuh gulma/tanaman pengganggu), akarisida (jenis pestisida yang berfungsi untuk membunuh tungau dan caplak), rodentisida (jenis pestisida yang berfungsi untuk membunuh binatang pengerat/tikus), dan nematosida (jenis pestisida yang berfungsi untuk membunuh nematoda dan sejenisnya). Diantara jenis insektisida organik sintetik yang sering digunakan dalam bidang pertanian dan rumah tangga adalah organofosfat dan karbamat. Keduanya menunjukkan persistensi yang rendah dalam alam sekitar (lingkungan), bersifat toksik akut yang



tinggi dalam tubuh hewan dan manusia, yang mampu menghambat asetilkolin dalam sistem syaraf (Abdul Aziz, 2002).

2.4.2 Insektisida Organofosfat

Senyawa organofosfat merupakan derivat dari asam fosfat. Senyawa ini tidak stabil, oleh karena itu dari segi lingkungan senyawa ini lebih baik dari pada organoklorin (jenis senyawa insektisida lain yang bersifat persisten terhadap lingkungan). Senyawa organofosfat dapat mempengaruhi sistem syaraf dengan cara menghambat kerja enzim Asetilkolinesterase (Sastroutomo, 1992). Beberapa contoh dari jenis senyawa ini, diantaranya adalah parathion, malathion dan paraoxon.

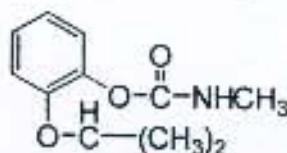


Gambar 4. Struktur Dietil-4-Nitrofenol Fosfat (Paraoxon)

2.4.3 Insektisida Karbamat

Karbamat merupakan jenis insektisida lain yang telah digunakan secara luas disamping organofosfat. Senyawa ini juga bersifat sebagai perintang (inhibitor) terhadap enzim Asetilkolinesterase (Sastroutomo, 1992).

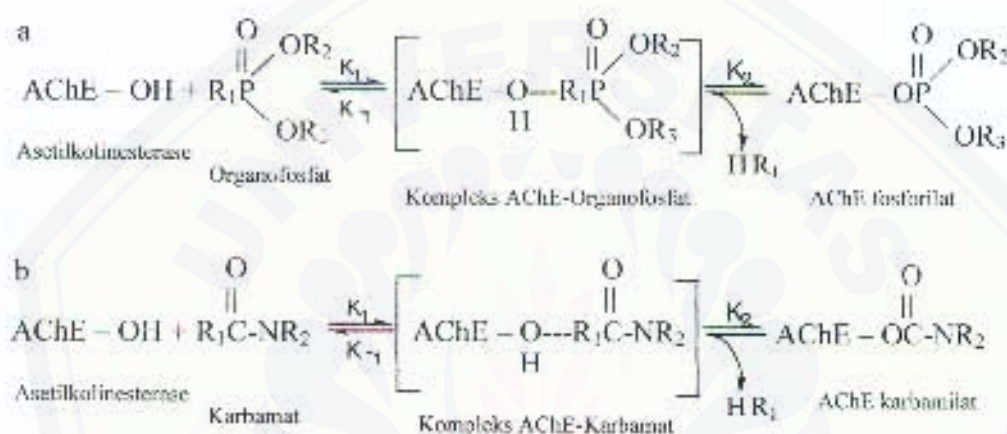
Diantara jenis insektisida karbamat yang sering digunakan adalah karbofuran, karbaril, dan baygon (bayer 39,0071).



Gambar 5. Struktur O-Isopropoksifenil Metilkarbamat (bayer39,0071/baygon)

2.4.4 Reaksi Inhibisi Insektisida Organofosfat dan karbamat terhadap Asetilkolinesterase

Reaksi yang terjadi antara enzim Asetilkolinesterase dengan organofosfat dan karbamat serupa dengan reaksi enzim-substrat, dimana kompleks enzim-pestisida pertama kali terbentuk, yang kemudian diikuti dengan transfer gugus asil pestisida pada serin OH dari Enzim dan membebaskan konkmitan sebagai produk samping HR_1 . Reaksi antara senyawa organofosfat dan karbamat dengan asetilkolinesterase ini ditunjukkan dalam reaksi:



Gambar 6. Reaksi Inhibisi Organofosfat (a) dan Karbamat (b) terhadap Asetilkolinesterase. (Andres, *et al.*, 1997)

2.5 Transduser Optik

2.5.1 Sistem Instrumentasi

Pada dasarnya biosensor berbasis serat optik memerlukan dua komponen yang utama, yaitu komponen optik dan elektronik. Kedua komponen tersebut, membutuhkan alat seperti; sumber sinyal, serat optik penghantar sinyal, sebuah transduser (fasa reagen) untuk menerjemahkan konsentrasi dari spesies kimiawi kedalam komponen modulasi sinar yang dapat diukur, sebuah detektor dan unit pemroses sinyal, serta sebuah *display* atau unit tampilan.

2.5.2 Prinsip Kerja Transduser Optik

Sinar dari sumber cahaya dilepaskan ke dalam serat optik dan secara langsung diarahkan ke dalam daerah dimana sinar ini berinteraksi dengan transduser biokimia (daerah pensensoran). Interaksi ini akan menghasilkan kumpulan sinyal optik yang tercatat sebagai informasi kimia. Sifat optik dari reagen dapat dimodulasi. Sinar modulasi yang kembali tersebut kemudian dikumpulkan dengan serat optik dan diarahkan ke sebuah detektor untuk kemudian diproses dalam unit pemroses sinyal untuk selanjutnya dimunculkan dalam sebuah tampilan (Kuswandi, 2001).

Berdasarkan pada alat pengukuran utama dan prinsip optik yang digunakan, sinyal optik yang diukur dapat berupa absorban, reflektan, dan luminescen. Transduser biasanya berisi reagen yang terimmobilisasi secara spesifik terhadap analit dan biasanya mampu mengukur analit hingga tingkat renik (Naranayaswamy, 1993).

2.5.3 Biosensor Berbasis Serat Optik

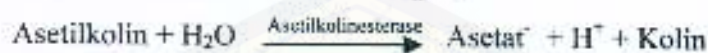
Pada Biosensor serat optik, untuk memonitor reaksi enzimatik yang terjadi, maka dibutuhkan suatu transduser optik. Hal ini didapatkan dengan menggunakan suatu indikator reagen, yang mengalami perubahan sifat optik selama reaksi enzimatik terjadi. Biosensor optik dapat dibedakan menjadi biosensor optik langsung dan biosensor optik tak langsung. Pada biosensor optik langsung, transduser optik yang digunakan dapat berupa O_2 , NH_3 , CO_2 , pH, serta ion selektif. Sedangkan pada biosensor optik tak langsung, menggunakan teknik deteksi spektroskopi (absorbansi, fluoresensi, kemiluminesensi, dan bioluminesensi).

2.5.4 Transduser pH

Beberapa reaksi yang dikatalisis oleh enzim dapat menyebabkan perubahan pH pada sampel dan dapat terdeteksi dengan menggunakan probe pH serat optik. Hal ini dapat dilakukan dengan menggabungkan enzim yang

terimmobilisasi dan suatu indikator pH yang sesuai dalam celupan pada ujung *probe* serat optik (Kuswandi, Andres, dan Narayanaswamy, 2001).

Pada reaksi enzimatik yang melibatkan Asetilkolinesterase, pengukuran aktifitas enzim dilakukan dengan mengukur penurunan pH yang terjadi selama reaksi hidrolisis terhadap substrat asetilkolin berlangsung. Reaksi katalisis yang dilakukan oleh Asetilkolinesterase ditunjukkan sebagai:



Kekurangan dari optode enzim yang didasarkan pada transduser pH adalah konsentrasi buffer kekuatan ionik dari sinyal. Perubahan pH yang kecil dari sampel dapat memberikan variasi yang signifikan dalam pengukuran sinyal. Konsentrasi buffer juga berpengaruh pada respon *optode* enzim. Sensitifitas yang rendah dan linear yang lebar dihasilkan oleh buffer dengan konsentrasi tinggi. Variasi kekuatan ionik dan pengaruh pada sinyal optode dengan merubah nilai pKa dari indikator hal ini terjadi pada pengukuran kekuatan ionik yang tinggi, pada penambahan garam *inert*, misalnya NaCl atau KCl (Kuswandi, *et al*, 1997).

2.6 Pengukuran Analitik Melalui Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri *UV-Vis* merupakan bagian teknik analisis spektroskopi yang memakai sumber radiasi elektromagnetik ultraviolet dekat dan daerah *visible* dengan memakai instrumen spektrofotometer (Mulja, 1995). Spektrofotometer adalah alat yang terdiri dari spektrometer dan fotometer. Spektrometer adalah alat yang menghasilkan sinar dari spektrum dengan panjang gelombang tertentu dan fotometer adalah alat pengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau yang diabsorpsi. Jadi spektrofotometer digunakan untuk mengukur intensitas energi gelombang elektromagnetik yang ditransmisikan, direfleksikan atau diemisikan sebagai fungsi dari panjang gelombang (Khopkar 1990). Secara umum gelombang elektromagnetik pada daerah *UV-Vis* terbagi menjadi tiga bagian, yaitu *visible*, *UV* dekat, dan *UV* jauh sebagaimana yang ditunjukkan pada tabel 2.

Tabel 2. Daerah panjang gelombang UV-Vis

Daerah	Panjang gelombang (nm)
<i>Visible</i>	400 – 700
<i>UV dekat</i>	190 – 400
<i>UV jauh</i>	100 - 190

Teknik analisis spektrofotometri ada dua macam yaitu spektrofotometri atom dan molekul. Spektrofotometri atom digunakan untuk mendeteksi keberadaan suatu atom dalam suatu senyawaan. Sedangkan spektrofotometri molekul digunakan untuk mengidentifikasi keberadaan gugus fungsi atau ikatan-ikatan kovalen antar atom dalam suatu senyawaan (Gani, 2000). Salah satu spektrofotometri molekul yang sering digunakan adalah spektrofotometri visible dan ultraviolet.

Spektroskopi serapan pada senyawa-senyawa organik didasarkan pada transisi elektron n dan π ke keadaan tereksitasi π^* . Hal ini disebabkan karena energi gelombang elektromagnetik yang diperlukan untuk proses ini cukup rendah, yaitu pada daerah spektrum 200 – 700 nm. Absorptivitas molar untuk puncak-puncak dengan keadaan tereksitasi n, π^* umumnya rendah dan biasanya berkisar antara $10 - 100 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ (Hendaya dkk., 1994).

Pergeseran puncak absorpsi dipengaruhi oleh kepolaran pelarut. Bertambahnya kepolaran pelarut pada transisi $n - \pi^*$, menyebabkan puncak absorpsi bergeser ke panjang gelombang yang lebih pendek (pergeseran biru atau hipsokromik), sedangkan transisi $\pi - \pi^*$ bergeser ke panjang gelombang yang lebih panjang (pergeseran merah atau batokromik). Pergeseran ini disebabkan gaya polarisasi antara pelarut dan spesies sehingga selisih tingkat energi eksitasi dan tingkat tidak tereksitasi menurun (Khopkar, 1990).

Pergeseran puncak absorpsi juga dipengaruhi oleh adanya aoksokrom. Aoksokrom adalah suatu gugus fungsi yang tidak mengabsorpsi di daerah

ultraviolet, tetapi berpengaruh terhadap pergeseran panjang gelombang dan intensitas dari serapan, misal $-OH$ dan $-NH_2$ mempunyai pengaruh auksokrom pada kromofor benzena. Pensubstitusi auksokrom mempunyai paling sedikit sepasang elektron n yang mampu berinteraksi dengan elektron π dari cincin benzena. Interaksi tersebut mempunyai pengaruh menstabilkan elektron π^* , menurunkannya energi akibat adanya pergeseran secara auksokromik (Hendayana dkk., 1994).

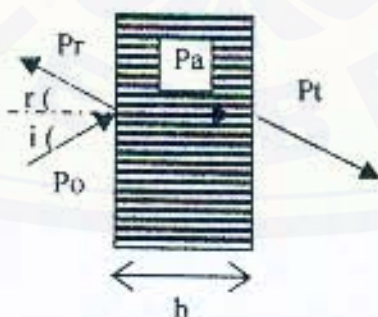
2.6.1 Hukum Lambert – Beer

Jika suatu sinar melewati suatu medium homogen, sebagian dari cahaya datang diabsorpsi dan dipantulkan, sedangkan sisanya ditransmisikan dengan efek intensitas murni sebesar:

$$P_0 = P_a + P_t + P_r \quad \dots\dots\dots(2.10)$$

Dimana; P_0 (intensitas radiasi yang masuk), P_a (intensitas cahaya yang diabsorpsi), P_r (intensitas bagian cahaya yang dipantulkan), P_t (intensitas cahaya yang ditransmisikan). Akan tetapi pada prakteknya, nilai P_r kecil sekali yaitu mendekati 4 %, sehingga untuk tujuan praktis

$$P_0 = P_a + P_t \quad \dots\dots\dots(2.11)$$



Gambar 7. Hukum Lambert- Beer

Lambert (1760) dan Beer (1852) menunjukkan hubungan antara intensitas cahaya datang (P_o), intensitas cahaya yang diteruskan (P_t) dan transmittan (T) sebagai berikut;

$$T = \frac{P_t}{P_o} = 10^{-abc} \quad \dots\dots\dots(2.12)$$

a = tetapan absorptivitas, b = jarak tempuh optik, c = konsentrasi

$$\log(T) = \log\left[\frac{P_t}{P_o}\right] = \log 10^{-abc} \quad \dots\dots\dots(2.13)$$

$$\log\left[\frac{1}{T}\right] = \log\left[\frac{P_o}{P_t}\right] = \log\frac{1}{10^{-abc}} = A \quad \dots\dots\dots(2.14)$$

A = absorbansi

$$\log\left[\frac{1}{T}\right] = \log\left[\frac{P_o}{P_t}\right] = \log 1 - \log 10^{-abc} = A \quad \dots\dots\dots(2.15)$$

$$\log\left[\frac{1}{T}\right] = \log\left[\frac{P_o}{P_t}\right] = 0 - (-abc) = A \quad \dots\dots\dots(2.16)$$

$$-\log T = abc = A \quad \dots\dots\dots(2.17)$$

$$A = abc \quad \dots\dots\dots(2.18)$$

Hukum diatas dapat ditinjau sebagai berikut:

- 1) Jika suatu berkas sinar radiasi monokromatik yang sejajar jatuh pada medium pengabsorpsi pada sudut tegak lurus setiap lapisan yang sangat kecil akan menurunkan intensitas berkas,
- 2) Jika suatu cahaya monokromatis mengenai suatu medium yang transparan, laju pengurangan intensitas dengan ketebalan medium sebanding dengan intensitas cahaya,
- 3) Intensitas berkas sinar monokromatis berkurang secara eksponensial bila konsentrasi zat pengabsorpsi bertambah (Khopkar, 1990)

2.6.2 Penyimpangan Hukum Beer

Jika sinar yang digunakan polikromatis, maka pita radiasi makin melebar sehingga kemungkinan tidak akan diperoleh garis lurus. Penyimpangan juga jelas teramati pada konsentrasi lebih besar. Pada kurva absorbansi terhadap konsentrasi kurva akan mulai melengkung pada daerah konsentrasi tinggi. Bila kurva kalibrasi yang diperoleh pada berbagai konsentrasi linear, maka hukum Beer berlaku. Penyimpangan negatif menyebabkan kesalahan relatif yang makin membesar dari konsentrasi sebenarnya (Khopkar, 1990).

2.7 Indikator Asam-Basa

Indikator asam basa adalah zat yang dapat berubah warna apabila pH lingkungannya berubah. Perubahan warna yang terjadi disebabkan karena adanya resonansi isomer elektron. Berbagai indikator mempunyai tetapan ionisasi yang berbeda yang mengakibatkan perbedaan warna pada range pH yang berbeda (Tabel 3). Warna yang ditunjukkan dalam keadaan asam dinamakan sebagai warna asam dari indikator, sedang warna yang ditunjukkan dalam keadaan basa disebut warna basa.

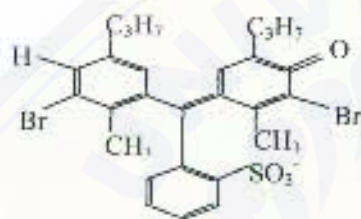
Tabel 3. Beberapa Jenis Indikator Asam-basa

No	Nama	Trayek pH	Warna	
			Asam	Basa
1	Asam pikrat	0.1 - 0.8	Tidak berwarna	Kuning
2	Biru timol	1.2 - 2.8	Merah	Kuning
		8.0 - 9.6	Kuning	Biru
3	2,6 - Dinitrofenol	2.0 - 4.0	Tidak berwarna	Kuning
4	Kuning metil	2.9 - 4.0	Merah	Kuning
5	Jingga metil	3.1 - 4.4	Merah	Jingga
6	Hijau bromkresol	3.8 - 5.4	Kuning	Biru
7	Merah metil	4.2 - 6.3	Merah	Kuning
8	Lakmus	4.5 - 8.3	Merah	Biru
9	Purpur bromkresol	5.2 - 6.8	Kuning	Unggu
10	Biru bomtimol	6.0 - 7.6	Kuning	Biru
11	Merah fenol	6.4 - 8.0	Kuning	Merah
12	p - a - Naftolftalein	7.0 - 9.0	Kuning	Biru
13	Purpur kresol	7.4 - 9.6	Kuning	Biru

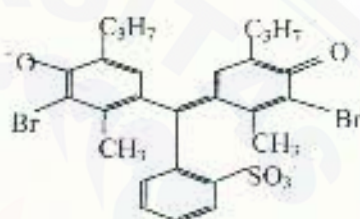
14	Fenolftalein	8.0 - 9.6	Tidak berwarna	Merah
15	Timolftalein	9.3 - 10.5	Tidak berwarna	Biru
16	Kuning alizarin R	10.1 - 12.0	Kuning	Violet
17	1,3,5 - Trinitrobenzen	12.0 - 14.0	Tidak berwarna	Jingga

Sumber : Harjadi, 1990.

Indikator *brom thymol blue* (3',3"- dibromothymolsulfonephthalein) merupakan salah satu indikator asam basa golongan sulfonephthalein. Dalam larutan asam indikator ini berwarna kuning, tetapi dalam lingkungan basa warnanya biru. Bromthymol blue mempunyai trayek indikator (trayek pH) dari pH 6,0 sampai 7,6. Bentuk disosiasi yang mungkin dari indikator ini adalah:



a. Kuning ($1 < \text{pH} < 6$)



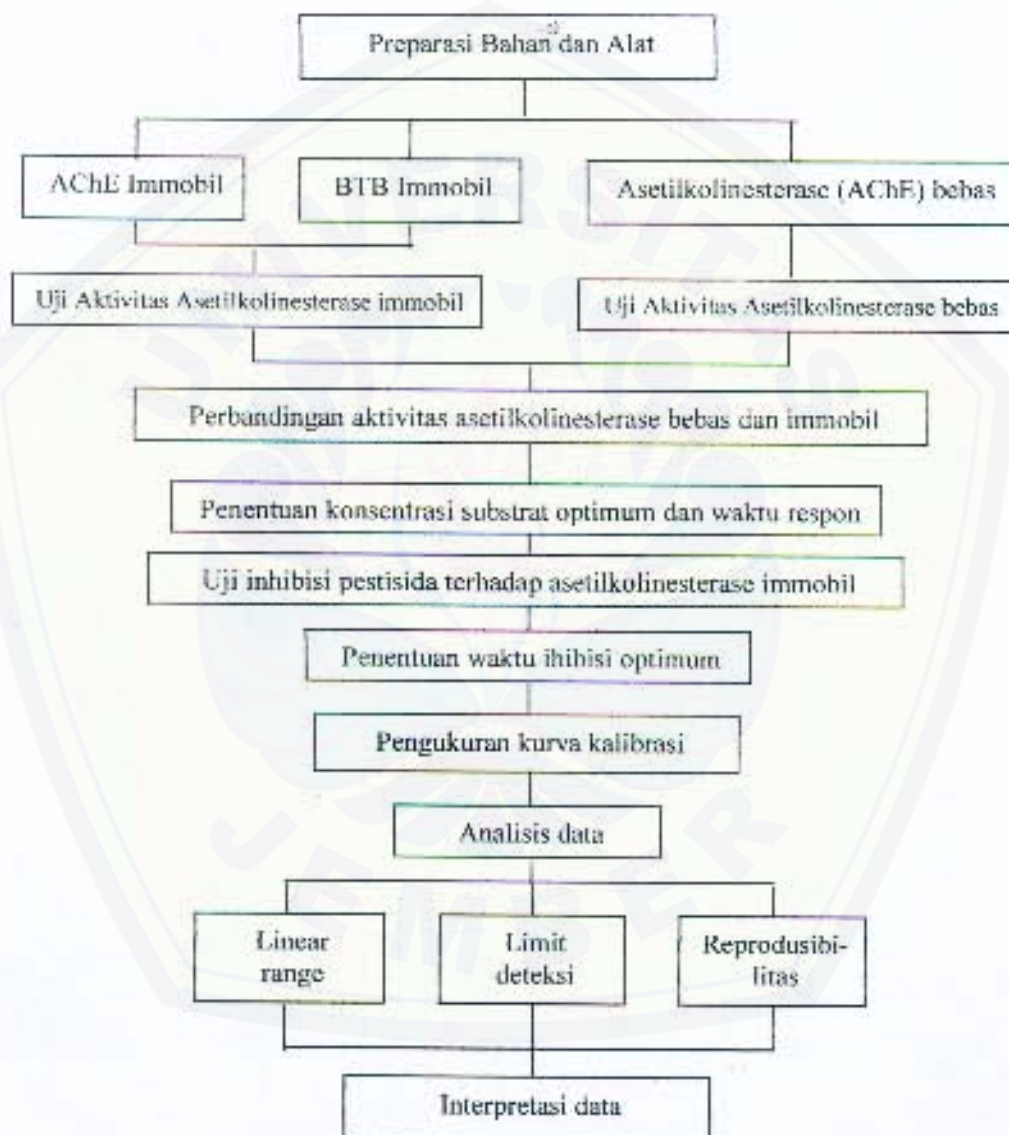
b. Biru ($\text{pH} > 7,6$)

Gambar 8. Bentuk Disosiasi dari Struktur Indikator *Brom Thymol Blue*

III. METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan dalam penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris. Secara skematis rancangan penelitian digambarkan sebagai berikut:



Gambar 9. Rancangan Penelitian

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Analitik dan Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember. Penelitian ini dilakukan mulai bulan Februari tahun 2004.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada pembentukan sol-gel adalah *beaker glass (pyrex)*, labu ukur 25 mL, 50 mL, dan 100 mL (*pyrex*), pipet volume 10 mL dan 25 mL (*pyrex*), pipet tetes, stirer magnetik dan anak stirer, cawan petri, selang plastik, desikator, pipet mohr 1 mL, 5 mL, dan 10 mL (*pyrex*), neraca analitik (*Ohaus*), dan lemari es. Alat-alat yang digunakan untuk preparasi dan pengukuran inhibisi pestisida terhadap asetilkolinesterase adalah *Ocean Optic Spectrometer USB 2000*, *probe optic*, *nylon mesh*, serat optik, *Spectronic 21 D*, kuvet *visible*, *stopwatch*, pH meter (*Jenway*), neraca analitik (*Ohaus*), lemari asam, beaker gelas 50 mL dan 100 mL (*pyrex*), labu ukur 25 mL dan 50 mL (*pyrex*), pipet volume 10 mL dan 25 mL (*pyrex*), pipet mohr 1 mL, 5 mL dan 10 mL (*pyrex*), dan pipet tetes.

3.3.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada pembuatan matrik immobilisasi terdiri dari *Tetramethyl Orthosilikat (TMOS)* (*st. Louis, MO*), etanol (C_2H_5OH) 96%, asetilkolinesterase (EC 3.1.1.7, *Type VI-S* dari *electric cel. lyophilized*, 317 unit per mg padatan, AChE) dari Sigma, HCl 0.1 M, *brom thymol blue*, natrium hidrogen fosfat (Na_2HPO_4), Natrium dihidrogen fosfat (NaH_2PO_4), dan aquades. Bahan-bahan yang digunakan untuk pengukuran inhibisi pestisida terhadap asetilkolinesterase adalah Asetilkolin klorit ($CH_3COOH_2CH_2N^+(CH_3)_3Cl$) dari Sigma, *Tris (hydroxymethyl) aminomethan* (7.5 mM), HCl 7.5 mM, *hydroxylamine hydrochloride* (dari Merck), dimetoat (O,O dimetil-S-methyl carbamoylmethyl) phosphorodioxide (Kanon) 400 g/L, dan Propuksur (o-isoproposifenil metil karbamat) 4,05 g/L Bayer 39,007/Baygon .

3.4 Langkah Kerja Penelitian

3.4.1 Preparasi Bahan

a. Pembuatan Larutan Buffer

Larutan buffer tris (7.5 mM) dengan pH 7.5 dibuat dari larutan tris (*hidroxymethyl*) aminometan dan HCl masing-masing dengan konsentrasi 7.5 mM dengan jumlah yang tepat. Sedangkan larutan buffer fosfat disiapkan dengan melarutkan garam natrium hidrogen fosfat (Na_2HPO_4) 0,1 M dan natrium dihidrogen fosfat NaH_2PO_4 0,1 M hingga diperoleh larutan buffer dengan pH 6.5 (diuji dengan pH meter).

b. Pembuatan Larutan Asetilkolin

Larutan asetilkolin dengan konsentrasi 5, 10, 15, 25, 50, 75, dan 100 mM disiapkan dengan melarutkan 18.15 gram asetilkolin klorid ($\text{CH}_3\text{COOH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^-$) dalam buffer tris 7.5 mM (yang diperoleh dari hasil 3.4.1) hingga mencapai 1000 mL untuk mendapatkan larutan induk asetilkolin 100 mM. Larutan induk tersebut kemudian diencerkan dengan buffer tris, sehingga diperoleh konsentrasi substrat asetilkolin 5, 10, 15, 25, 50, 75, dan 100 mM

c. Pembuatan Larutan Hidroksilamin Hidroklorida

Larutan Hidroksilamin Hidroklorida (NH_2OHCl) dengan konsentrasi 1 mM diperoleh dengan cara menimbang sebanyak 0,00695 gram kristal NH_2OHCl dan diencerkan dengan larutan buffer tris 7,5 mM (pH 7,5) dalam labu ukur 100 mL sampai tanda batas.

d. Pembuatan Larutan Standar Dimetoat

Sebanyak 0,125 mL larutan dimetoat 400 g/L diencerkan dalam labu ukur 50 mL dengan buffer tris 7,5 mM (pH 7,5) sampai tanda batas untuk mendapatkan larutan induk dimetoat 1000 ppm. Larutan induk 1000 ppm tersebut selanjutnya diencerkan kembali dengan larutan buffer tris 7,5 mM (pH 7,5) untuk memperoleh

konsentrasi dimetoat 10, 50, 100, 250, 500, 1000, dan 2000 ppb sebagai larutan standar.

e. Pembuatan Larutan Standar Propuksur

Sebanyak 12,35 mL larutan propuksur (haygon) 4,05 g/L diencerkan dalam labu ukur 50 mL dengan buffer tris 7,5 mM (pH 7,5) sampai tanda batas untuk mendapatkan larutan induk propuksur 1000 ppm. Larutan induk 1000 ppm tersebut selanjutnya diencerkan kembali dengan larutan buffer tris 7,5 mM (pH 7,5) untuk memperoleh konsentrasi propuksur 5, 10, 25, 50, 75, 100, dan 250 ppb sebagai larutan standar.

f. Pembuatan Larutan indikator Brom Thymol Blue (BTB) cair

Larutan BTB cair disiapkan dengan melarutkan sebanyak 1,5 mg kristal BTB kedalam pelarut etanol-air, dengan perbandingan volume 20:80 mL.

3.4.2 Teknik Immobilisasi

a. Immobilisasi Asetilkolinesterase dengan Teknik Sol-Gel

Immobilisasi asetilkolinesterase dengan teknik sol-gel dilakukan melalui dua tahap. Tahap pertama adalah penyiapan larutan sol, dengan cara mencampur 4,5 mL TMOS, 2 mL etanol 96%, 0,5 mL HCl 0.1 M, dan 2,25 mL aquades yang kemudian distirer selama enam jam, dimana selama proses berlangsung larutan ditutup dengan aluminium foil. Tahap kedua adalah proses immobilisasi asetilkolinesterase. Pada tahap ini 1,5 mL sol, setelah itu ditambahkan 1,5 mL buffer fosfat pH 6.5 dan 0,5 mL asetilkolinesterase distirer selama 10 menit, dimana selama proses immobilisasi kondisi dijaga pada temperatur 4°C.

b. Immobilisasi Indikator Bromtimol blue dengan Teknik Sol-Gel

Immobilisasi bromtimol blue (BTB) dengan teknik sol-gel dilakukan dengan cara mencampur 3 mL sol (prosedur 3.4.2.a) dengan 0.5 mg *brom thymol blue* (BTB). Larutan ini kemudian distirer selama empat jam kemudian dicetak

menurut prosedur 3.4.2.a dan selanjutnya disimpan dalam desikator selama 1 minggu untuk proses pengeringan.

3.4.3 Desain Alat dan Prosedur Pengukuran Biosensor Pestisida Berbasis Asetilkolinesterase Immobil

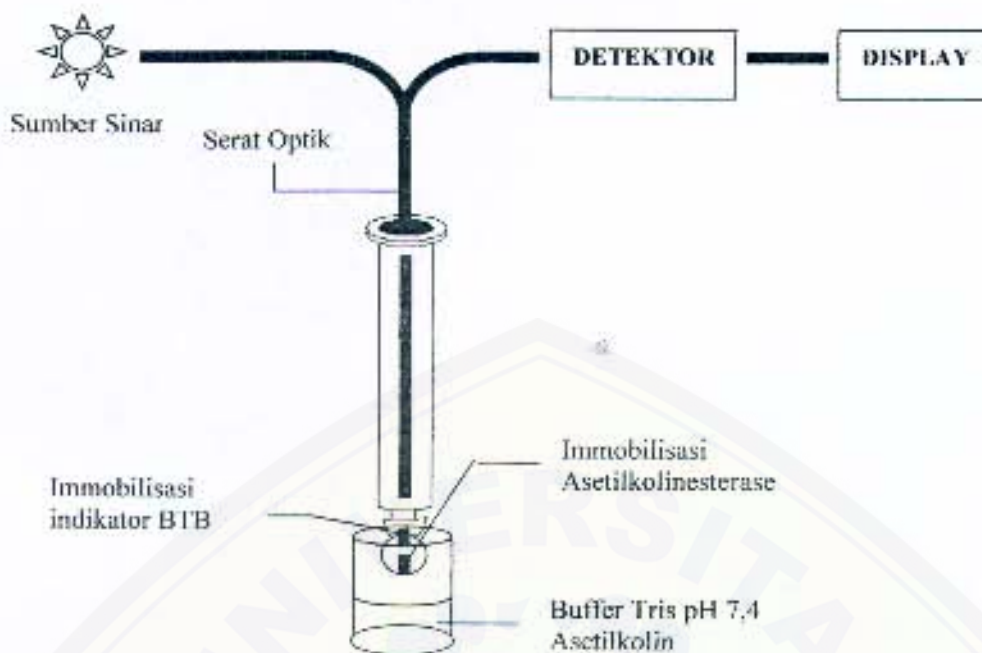
Pengujian aktivitas asetilkolinesterase bebas dan immobil dilakukan dengan menggunakan *ocean optic spectrofotometer* melalui sistem batch (Kuswandi *et al.*, 2001). Pengukuran dilakukan dengan memasukkan probe dari serat optik yang mengandung indikator *brom thymol blue* dan enzim asetilkolinesterase terimmobilisasi ke dalam wadah larutan analit. Indikator *brom thymol blue* dan enzim asetilkolinesterase terimmobilisasi yang berada dalam bentuk padatan sol-gel sebelumnya digerus, kemudian dicampurkan menjadi satu untuk kemudian ditempatkan di bagian dalam probe. Untuk menahan indikator dan enzim yang ditempatkan di bagian dalam probe ketika proses pengukuran, maka bagian ujung probe dilapisi/ dibungkus dengan kain nylon mesh. Reaksi hidrolisis asetilkolin menghasilkan senyawa kolin dan asam asetat. Adanya senyawa asam asetat yang dihasilkan menandakan adanya perubahan pH, sehingga terdeteksi oleh indikator *bromthymol blue* yang ditandai dengan perubahan warna indikator. Interaksi antara sumber sinar (lampu halogen) yang melalui serat optik dengan indikator *bromthymol blue* yang berubah warna menghasilkan sebuah modulasi sinyal optik (yang berhubungan dengan informasi kimiawi), selanjutnya ditangkap dengan serat optik lain dan dikirim ke sistem pengukuran sinyal optik (fotodetektor) yang dihubungkan dengan sistem komputer, sehingga besarnya intensitas reflektan dapat terukur (Kuswandi, 2001).

Pengujian inhibisi pestisida terhadap asetilkolinesterase immobil dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Pengukuran dilakukan dengan melihat selisih intensitas enzim immobil yang bereaksi dengan substrat sebelum dan sesudah terinhibisi oleh pestisida.

$$\% \text{ Inhibisi} = E_0 - E \times 100 \%$$

dimana: E = respon sensor sebelum diinhibisi

E_0 = respon sensor setelah diinhibisi



Gambar 10. Desain alat biosensor serat optik pestisida berbasis asetilkolinesterase dan *brom thymol blue* immobil

3.4.4 Optimasi Parameter

a. Penentuan Panjang Gelombang (λ) Maksimum Bromthimol Blue (BTB)

Penentuan panjang gelombang (λ) maksimum BTB dilakukan untuk pengukuran aktivitas asetilkolinesterase. Pengukuran panjang gelombang (λ) maksimum BTB immobil dilakukan dalam larutan pH 7.5 yang diukur pada panjang gelombang 400 – 800 nm menggunakan *Ocean Optic spectrometer* USB 2000, sedangkan pengukuran panjang gelombang (λ) maksimum BTB cair dilakukan dengan menggunakan *spectronic 21D*.

b. Penentuan Konsentrasi Substrat Optimum

Konsentrasi substrat optimum merupakan konsentrasi substrat yang menghasilkan produk reaksi enzimatik yang maksimum dimana enzim menggunakan semua sisi aktifnya untuk mengkatalisis terjadinya hidrolisa. Penentuan konsentrasi substrat ini dilakukan pada panjang gelombang optimum

dan larutan asetilkolin divariasikan dengan konsentrasi 5, 10, 15, 25, 50, 75, dan 100 mM. Konsentrasi asetilkolin yang menunjukkan produk reaksi terbanyak merupakan konsentrasi substrat optimumnya.

c. Pengukuran Waktu Respon Substrat

Waktu respon merupakan waktu yang dibutuhkan dalam pengukuran produk reaksi agar didapat intensitas sinyal yang maksimum dan diukur dengan menggunakan larutan asetilkolin dengan konsentrasi dari hasil 3.4.4.b sebagai larutan substrat. Waktu respon divariasikan selama beberapa menit, yaitu satu hingga lima belas menit.

d. Penentuan Waktu Inhibisi Optimum

Waktu inhibisi optimum merupakan waktu yang diperlukan oleh suatu inhibitor untuk menginhibisi aktivitas katalitik enzim asetilkolinesterase, sehingga enzim kehilangan aktivitas katalitiknya. Waktu inhibisi optimum ditentukan dengan memvariasikan lamanya inhibisi asetilkolinesterase oleh pestisida organofosfat (paraoxon) dan karbamat (bayer 39,007/baygon) pada durasi waktu 1 sampai 15 menit.

3.4.5 Reaktivasi Asetilkolinesterase

Enzim yang telah diinhibisi oleh pestisida dapat diaktifkan kembali dengan menggunakan reagen reaktivator hidroksilamin hidroklorida. Teknik reaktivasi dilakukan dengan menggunakan dimetoat atau propuksur 1000 ppm sebagai larutan inhibitor uji, substrat asetilkolin dengan konsentrasi dari hasil 3.4.4.b.

3.5 Karakteristik Metrologis Biosensor Serat Optik

3.5.1 Penentuan *Linier Range*

Linier range menyatakan rentang log konsentrasi pestisida yang memberikan nilai inhibisi linear terhadap perubahan konsentrasi pestisida. Respon yang linear dari grafik ditunjukkan pada persamaan garis sebagai berikut:

$$y = bx + a \quad \dots\dots\dots(3.1)$$

Dimana; b = Slope/kemiringan, a = Intersep (perpotongan terhadap sumbu y)
(Caulcutt and Boddy, 1983).

3.5.2 Limit Deteksi

Limit deteksi merupakan konsentrasi terendah dari suatu analit yang masih dapat ditentukan atau dideteksi (Miller and Miller, 1991). Untuk menentukan batas deteksi dari sensor ini dilakukan dengan mencari nilai penyimpangan dari kurva kalibrasi ($S_{y/x}$). Nilai ini ditentukan dengan persamaan :

$$S_{\frac{y}{x}} = \left\{ \frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2} \right\}^{\frac{1}{2}} \quad \dots\dots\dots(3.2)$$

Langkah berikutnya dengan memasukkan nilai $S_{y/x}$ dalam persamaan LOD :

$$LOD = y + 3 SD \quad \dots\dots\dots(3.3)$$

Dimana : SD = $S_{y/x}$ = standar deviasi dari kurva kalibrasi
y = Intersep dari kurva kalibrasi

3.5.3 Reprodusibilitas

Reprodusibilitas merupakan kepresisian atau kebolehlulangan suatu hasil pengukuran suatu alat ukur tertentu. Kemampuan asetilkolinesterase immobil sebagai alat ukur pestisida perlu diuji reprodusibilitasnya. Reprodusibilitas asetilkolinesterase immobil ditentukan dengan terlebih dahulu menghitung nilai inhibisi rata-rata dan standart deviasinya (Caulcutt and Boddy, 1983).

Hasil pengulangan pengukuran inhibisi pestisida terhadap asetilkolinesterase immobil yang memiliki reprodusibilitas yang baik disebut presisi. Suatu pengukuran dikatakan presisi jika sekumpulan harga yang diperoleh dari pengukuran secara berulang memiliki deviasi yang kecil. Kepresisian suatu

pengukuran dinyatakan sebagai koefisien variasi (Kv). Harga Kv ditentukan dengan persamaan berikut:

$$Kv = \left[\frac{SD}{x} \right] 100\% \dots\dots\dots(3.5)$$

Dimana: SD = standar deviasi, x = signal rata-rata, Kv = koefisien variasi



V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

- 1) Proses pembuatan enzim asetilkolinesterase immobil dengan teknik sol-gel dapat dihasilkan dengan melarutkan 1,5 mL larutan sol-gel (mengandung 4,5 mL Tetra Metil Ortosilikat (TMOS), 2 mL etanol 96%, 2,25 mL aquadest, dan 0,5 mL HCl), 1,5 mL Buffer phospat pH 6,5 serta 0,5 larutan enzim.
- 2) Kondisi optimum dari biosensor berbasis asetilkolinesterase yang terimmobilisasi dengan teknik sol-gel meliputi; konsentrasi substrat optimum yang digunakan adalah 50 mM (diukur pada panjang gelombang maksimum indikator Brom Timol Blue (BTB) immobil 590 nm; waktu respon substrat 10 menit dan waktu inhibisi pestisida optimum 8 menit (diukur pada panjang gelombang maksimum indikator BTB cair 620 nm).
- 3) Karakteristik metrologis dari biosensor berbasis asetilkolinesterase immobil ini yaitu *linear range* dari pestisida dimetoat pada daerah konsentrasi antara 10 – 250 ppb, sedangkan berdasarkan kurva log konsentrasi, *linear range* pada daerah konsentrasi 50 – 1000 ppb. Pada pestisida propuksur, *linear range* pada range konsentrasi 5 – 100 ppb, sedangkan berdasarkan kurva log konsentrasi, *linear range* pada range konsentrasi 5 – 100 ppb; limit deteksi yang dihasilkan untuk dimetoat adalah 10,677 ppb, sedangkan untuk propuksur adalah 3,547 ppb.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini, penulis menyarankan untuk dilakukan penelitian lanjutan tentang proses immobilisasi asetilkolinesterase dengan metode sol-gel (meliputi komposisi penambahan larutan Tetra Metil Orto Silikat (TMOS) pada saat pembentukan matrik silikat SiO_2 , serta waktu *aging* dan *drying* ketika pembentukan matrik xerogel) sehingga dihasilkan membran yang lebih baik, yang dapat digunakan sebagai salah satu elemen biosensor pestisida. Selain itu, terhadap indikator *brom thymol blue* (BTB) yang digunakan sebagai transduser optik melalui pengukuran *ocean optic spectrometer*.



DAFTAR PUSTAKA

- Aiba, S. 1973. *Biochemical Engineering*, 2nd. University of Tokyo press: Tokyo, p: 397-400
- Andres, R.T., and Narayanaswamy, R. 1997. *Fiber-Optic Pesticide Biosensor Based on Covalently Immobilized Acetylcholinesterase and thymol blue*. *Talanta*. vol. 44. p: 1335-1352
- Azis, A.S. 2002. *Potential Application of Enzymes Entrapped in Sol-Gel for pre-Screening of Organophosphorus Pesticide Residues in Environment*. http://www.pkukmweb.ukm.my/~kimia/ukmith_2002/abstrak_ukm/Salmah_abs.htm
- Buckley, A.M., and Greenblatt, M. 1994. *The Sol-Gel Preparation of Silica Gels*. vol. 71. p: 599-602
- Caulcutt, R., and Boddy, R. 1986. *Statistic for Analytical Chemistry*. Chapman and hall: London
- Chibata, I. 1978. *Immobilized Enzymes*. Kodansa Ltd. Hasted Press
- Dave, B.C., Dunn, B., Valentine, J.S., and Zink, J.I. 1994. *Analytical Chemistry*. vol. 66, No.22. p: 1120A-1127A
- Eggins, B. R. 1996, *Biosensor: an Introduction*. John Wiley and Sons. Ltd
- Ellerby, I.M., Nishida, C.R., Nishida, F., Yamanaka, S.A., Dunn, B.S., et al. 1992. *Science*. vol.255. p: 1113
- Gani, A. A. 2000. *Karakterisasi Spektra Infra Merah Senyawa P₂O₅*. *Jurnal Ilmu Dasar*. Vol. 1. No. 1. p. 29 – 33
- Harjadi, W. 1990. *Ilmu Kimia Analitik Dasar*. Gramedia. Jakarta
- Hendayana, S., Kadarohman, A., Sumarna, A. A., Supriatna, A. 1994. *Kimia Analitik Instrumen*. Semarang: IKIP Semarang.
- Hermawan, D.H. 2000. *Mengenal Biosensor dan Generasi Terbaru Biosensor*. Seminar on Air-PPI Tokyo Institute of Technology 1999-2000 No.1. p: 78-85. <http://www.std.ryo.titech.ac.jp/~indonesia/tokodai/zoa/pdf>
- Holme, D.J., and Hazel, R. 1998. *Analytical Biochemistry*. Addison Wesley Longman; NewYork

<http://www.jaist.ac.jp/yokoyama/biosensor>

- Isvasta, E. 1988. *Dilema Pestisida Tragedi Revolusi Hijau*. Kanisius: Yogyakarta
- Khopkar, S.M. 1990. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Universitas Indonesia Press: Jakarta
- Kierstan, M.P.J., and Coughlan, M.P. 1985. *Immobilization of Cell and Enzymes by Gel Entrapmen*. Dalam: J. Wood wand (ed), *Immobilized Cells and Enzymes. A Practical Approach*. Oxford: IRI Pr. p: 39-48
- Kuswandi, B., Andres, R.T., and Narayanaswamy, R. 2001. *Optical Fiber Biosensor Based on Immobilized Enzymes*. Tutorial Review. *Analyst*. vol.126. p: 1469-1491
- Kuswandi, B. 2001. *Sensor Kimia Serat Optik: Konsep, Disain dan Instrumentasi*. Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember: Jember
- Lehninger, A.L. 1997. *Dasar-dasar Biokimia Jilid 1*. Terjemahan Meggi Thenawijaya dari *Principles of Biochemistry* (1982). Penerbit Erlangga: Jakarta
- Miller, J.C., and Miller, J.C. 1991. *Statistic for Analytical Chemistry*. Ellis Harwood. PTR PENTILE Hall: NewYork
- Narayanaswamy, R. 1993. *Optical Chemical Sensor: Transduction and Processing*. Tutorial Review. *Analyst*
- Sastroutomo, S.S. 1992. *PESTISIDA. Dasar-dasar dan Dampak Penggunaannya*. PT Gramedia Pustaka utama: Jakarta
- Simon, S. 1984. *Analisa Residu Pestisida Aziodrin dan Diazimon dalam Air Sawah dengan Kromatografi Gas*. Skripsi. Jurusan Kimia, FMIPA. Universitas Gajah Mada: Yogyakarta
- Stryer, L. 2000. *Biokimia*. Edisi keempat. Terjemahan tim penterjemah Bagian Biokimia FKUI dari *Biochemistry* (1995). Penerbit buku Kedokteran EGC: Jakarta
- Sudarmo, S. 1991. *Pestisida*. Kanisius. Yogyakarta
- Tarumingkeng, R.C. 1992. *Insektisida; Sifat, Mekanisme Kerja dan Dampak Penggunaannya*. UKRIDA press. p: 250

Tarumingkeng, R.C. 1992. *Insektisida; Sifat, Mekanisme Kerja dan Dampak Penggunaannya*. UKRIDA press. p: 250

West, E.S., and Todd, W.R. 1961. *Textbook of Biochemistry 3rd*. The Macmillan Company: NewYork

Zubay, Geoffrey. I.. 1989. *Biochemistry 2nd*. Macmillan Publishing Company: NewYork



Lampiran 1

Data Perbandingan Aktivitas Enzim Asetilkolinesterase Bebas dan Immobil

Data Enzim Bebas

Larutan	Intensitas			Rata-rata	Selisih Analit dan Blank	
	u1	u2	u3			
Blank	120.631	121.522	121.491	121.215		
Asetilkolin (mM)	5	125.199	125.318	125.440	125.319	4.104
	10	126.349	126.112	125.569	126.010	4.795
	15	129.812	129.769	129.834	129.805	8.590
	20	132.999	133.156	133.155	133.103	11.889
	25	133.752	133.672	133.673	133.699	12.484

Data Enzim Immobil

Larutan	Intensitas			Rata-rata	Selisih Analit dan Blank	
	u1	u2	u3			
Blank	126.742	126.887	126.952	126.860		
Asetilkolin (mM)	5	130.078	130.169	130.663	130.100	3.240
	10	129.888	130.208	130.546	130.214	3.354
	15	130.602	131.378	131.415	131.132	4.271
	20	132.478	132.594	132.497	132.522	5.662
	25	133.698	133.798	133.865	133.787	6.927

Lampiran 2

Data Scanning Panjang Gelombang Indikator BTB Immobil

Lambda	Blank			Rata-rata	Analit			Rata-rata	A - B
	u1	u2	u3		u1	u2	u3		
400.21	107.823	108.010	107.861	107.898	107.765	107.711	107.627	107.701	-0.197
405.00	107.831	108.031	107.890	107.917	107.790	107.719	107.619	107.709	-0.208
410.13	107.832	108.015	107.854	107.900	107.790	107.695	107.610	107.698	-0.202
415.25	107.793	107.959	107.787	107.846	107.744	107.628	107.590	107.654	-0.192
420.02	107.860	108.002	107.859	107.907	107.726	107.681	107.622	107.693	-0.214
425.12	107.791	107.970	107.787	107.849	107.730	107.622	107.578	107.643	-0.206
430.22	107.687	107.864	107.688	107.746	107.652	107.490	107.468	107.537	-0.210
435.31	107.626	107.822	107.658	107.719	107.602	107.541	107.444	107.529	-0.190
440.05	107.720	107.834	107.648	107.734	107.614	107.515	107.431	107.520	-0.214
445.13	107.790	107.861	107.694	107.782	107.668	107.529	107.475	107.557	-0.224
450.19	107.793	107.810	107.688	107.764	107.651	107.491	107.434	107.525	-0.238
455.25	107.790	107.836	107.715	107.780	107.700	107.565	107.467	107.577	-0.203
460.30	107.719	107.786	107.660	107.722	107.619	107.519	107.424	107.521	-0.201
465.01	107.750	107.808	107.663	107.740	107.610	107.549	107.408	107.522	-0.218
470.04	107.741	107.775	107.629	107.715	107.626	107.522	107.456	107.535	-0.180
475.07	107.733	107.720	107.637	107.697	107.607	107.534	107.513	107.551	-0.145
480.08	107.822	107.786	107.711	107.773	107.674	107.608	107.572	107.618	-0.155
485.09	107.890	107.825	107.755	107.823	107.713	107.703	107.632	107.683	-0.141
490.09	107.834	107.806	107.718	107.786	107.696	107.647	107.627	107.657	-0.129
495.08	107.805	107.781	107.697	107.761	107.692	107.653	107.644	107.663	-0.098
500.07	107.782	107.750	107.664	107.732	107.677	107.641	107.574	107.631	-0.101
505.04	107.744	107.733	107.672	107.716	107.633	107.629	107.559	107.607	-0.109
510.01	107.765	107.728	107.686	107.726	107.652	107.663	107.610	107.642	-0.085
515.29	107.761	107.799	107.678	107.746	107.668	107.730	107.623	107.674	-0.072
520.24	107.751	107.871	107.696	107.773	107.721	107.784	107.640	107.715	-0.058
525.18	107.886	107.999	107.826	107.904	107.848	107.930	107.776	107.851	-0.052
530.10	107.960	108.092	107.920	107.991	107.979	108.007	107.917	107.968	-0.023
535.02	108.054	108.217	108.012	108.093	108.126	108.165	108.046	108.112	0.019
540.26	108.198	108.355	108.165	108.239	108.291	108.311	108.192	108.265	0.025
545.16	108.355	108.517	108.294	108.389	108.468	108.497	108.319	108.428	0.039
550.05	108.455	108.630	108.421	108.502	108.713	108.669	108.497	108.626	0.124
555.25	108.686	108.831	108.671	108.729	109.030	108.969	108.782	108.927	0.198
560.12	108.897	109.029	108.910	108.945	109.248	109.195	108.978	109.140	0.195
565.30	109.178	109.305	109.191	109.225	109.565	109.539	109.333	109.479	0.254
570.15	109.391	109.539	109.425	109.452	109.860	109.810	109.637	109.769	0.317
575.31	109.645	109.748	109.686	109.693	110.150	110.110	109.837	110.032	0.339
580.14	109.883	109.932	109.857	109.891	110.350	110.320	110.047	110.239	0.348
585.28	110.074	110.032	110.033	110.046	110.539	110.469	110.276	110.428	0.382
590.09	110.186	110.132	110.158	110.159	110.678	110.576	110.370	110.541	0.383
595.20	110.377	110.277	110.311	110.322	110.798	110.755	110.487	110.680	0.358
600.30	110.517	110.404	110.454	110.458	110.942	110.861	110.552	110.785	0.327
605.08	110.486	110.415	110.436	110.446	110.956	110.870	110.535	110.787	0.341
610.16	110.501	110.495	110.484	110.493	110.932	110.914	110.525	110.790	0.297

Lambda	Blank			Rata-rata	Analit			Rata-rata	A - B
	u1	u2	u3		u1	u2	u3		
615.23	110.499	110.443	110.455	110.466	110.826	110.877	110.466	110.723	0.257
620.28	110.506	110.450	110.468	110.475	110.778	110.836	110.463	110.692	0.218
625.01	110.485	110.418	110.402	110.435	110.747	110.819	110.394	110.653	0.218
630.04	110.407	110.375	110.360	110.381	110.649	110.694	110.268	110.537	0.156
635.06	110.315	110.301	110.287	110.301	110.480	110.540	110.160	110.393	0.092
640.07	110.238	110.249	110.187	110.225	110.385	110.392	110.075	110.284	0.059
645.06	110.107	110.157	110.122	110.129	110.298	110.271	109.959	110.176	0.047
650.04	109.995	110.078	110.003	110.025	110.194	110.182	109.834	110.070	0.045
655.01	109.876	109.998	109.898	109.924	110.043	110.057	109.768	109.956	0.032
660.28	109.758	109.858	109.768	109.795	109.904	109.911	109.643	109.819	0.025
665.22	109.634	109.744	109.665	109.681	109.734	109.804	109.533	109.690	0.009
670.14	109.521	109.617	109.525	109.554	109.592	109.664	109.396	109.551	-0.004
675.06	109.440	109.508	109.439	109.462	109.519	109.527	109.327	109.458	-0.005
680.26	109.259	109.367	109.229	109.285	109.361	109.340	109.133	109.278	-0.007
685.15	109.115	109.259	109.081	109.152	109.192	109.139	108.966	109.099	-0.053
690.02	108.903	109.050	108.876	108.943	108.953	108.899	108.799	108.884	-0.059
695.18	108.682	108.837	108.664	108.728	108.801	108.701	108.616	108.706	-0.022
700.03	108.507	108.683	108.542	108.577	108.635	108.528	108.446	108.536	-0.041
705.16	108.351	108.519	108.381	108.418	108.491	108.360	108.280	108.377	-0.041
710.27	108.205	108.309	108.185	108.233	108.248	108.187	108.069	108.168	-0.065
715.07	108.168	108.212	108.090	108.157	108.151	108.086	107.937	108.058	-0.099
720.16	108.068	108.133	107.957	108.053	108.059	108.019	107.804	107.961	-0.092
725.22	107.930	107.989	107.814	107.911	107.919	107.841	107.640	107.800	-0.111
730.28	107.820	107.870	107.700	107.797	107.805	107.717	107.551	107.691	-0.106
735.01	107.652	107.750	107.545	107.649	107.671	107.582	107.401	107.551	-0.098
740.03	107.577	107.677	107.525	107.593	107.575	107.500	107.329	107.468	-0.125
745.04	107.506	107.570	107.477	107.518	107.504	107.511	107.291	107.435	-0.082
750.02	107.495	107.529	107.455	107.493	107.479	107.528	107.244	107.417	-0.076
755.28	107.580	107.505	107.448	107.511	107.496	107.556	107.244	107.432	-0.079
760.23	107.558	107.483	107.424	107.488	107.453	107.534	107.231	107.406	-0.082
765.16	107.582	107.461	107.423	107.489	107.450	107.547	107.263	107.420	-0.069
770.08	107.576	107.480	107.483	107.513	107.474	107.533	107.258	107.422	-0.091
775.27	107.509	107.412	107.447	107.456	107.446	107.438	107.185	107.356	-0.100
780.14	107.542	107.409	107.513	107.488	107.455	107.426	107.187	107.356	-0.132
785.01	107.531	107.415	107.480	107.475	107.479	107.405	107.156	107.347	-0.129
790.13	107.596	107.412	107.516	107.508	107.513	107.434	107.213	107.387	-0.121
795.24	107.595	107.405	107.505	107.502	107.494	107.403	107.219	107.372	-0.130
800.05	107.620	107.434	107.491	107.515	107.463	107.375	107.258	107.365	-0.150

Lampiran 3

Data Scanning Panjang Gelombang Indikator BTB Cair

Lamda	Blank			Rata-Rata	Substrat			Rata-Rata	A-B
	u1	u2	u3		u1	u2	u3		
400	0.990	0.996	0.992	0.993	1.090	1.095	1.095	1.093	-0.101
410	0.879	0.890	0.882	0.884	1.048	1.054	1.050	1.051	-0.167
420	0.745	0.747	0.754	0.749	0.982	0.988	0.984	0.985	-0.236
430	0.591	0.595	0.594	0.593	0.890	0.894	0.892	0.892	-0.297
440	0.479	0.482	0.481	0.481	0.791	0.802	0.796	0.796	-0.316
450	0.420	0.421	0.424	0.422	0.723	0.726	0.726	0.725	-0.303
460	0.417	0.418	0.421	0.419	0.676	0.688	0.680	0.682	-0.263
470	0.531	0.540	0.533	0.535	0.743	0.826	0.746	0.772	-0.237
480	0.872	0.870	0.874	0.872	0.986	0.974	1.010	0.990	-0.116
490	0.735	0.734	0.736	0.736	0.758	0.726	0.794	0.759	-0.024
500	0.581	0.569	0.585	0.578	0.560	0.547	0.565	0.557	0.021
510	0.493	0.498	0.498	0.496	0.400	0.398	0.407	0.402	0.095
520	0.460	0.460	0.462	0.461	0.279	0.276	0.285	0.280	0.181
530	0.473	0.479	0.477	0.476	0.223	0.216	0.225	0.221	0.255
540	0.538	0.540	0.540	0.539	0.205	0.200	0.212	0.206	0.333
550	0.636	0.636	0.638	0.636	0.227	0.217	0.231	0.225	0.411
560	0.760	0.756	0.762	0.759	0.262	0.256	0.273	0.264	0.496
570	0.898	0.900	0.908	0.902	0.318	0.314	0.334	0.322	0.580
580	1.043	1.040	1.044	1.042	0.390	0.382	0.404	0.392	0.650
590	1.190	1.185	1.195	1.190	0.471	0.462	0.482	0.472	0.718
600	1.330	1.330	1.335	1.332	0.559	0.548	0.567	0.558	0.774
610	1.430	1.430	1.440	1.433	0.635	0.623	0.642	0.633	0.800
620	1.440	1.440	1.450	1.443	0.641	0.639	0.657	0.646	0.798
630	1.335	1.330	1.340	1.335	0.576	0.562	0.580	0.573	0.762
640	1.051	1.054	1.052	1.052	0.389	0.387	0.395	0.390	0.662
650	0.824	0.832	0.820	0.825	0.342	0.345	0.347	0.345	0.481
660	0.423	0.439	0.425	0.429	0.112	0.114	0.115	0.114	0.315
670	0.067	0.075	0.065	0.069	-0.116	-0.115	-0.110	-0.114	0.183

Lampiran 4

Data Waktu Respon Substrat

Waktu (menit)	Intensitas			Rata-rata
	u1	u2	u3	
0	0.368	0.328	0.356	0.351
1	0.356	0.314	0.348	0.339
2	0.352	0.308	0.345	0.335
3	0.290	0.276	0.283	0.283
4	0.265	0.250	0.254	0.256
5	0.258	0.246	0.245	0.250
6	0.248	0.235	0.229	0.237
7	0.243	0.230	0.226	0.233
8	0.240	0.227	0.224	0.230
9	0.239	0.225	0.222	0.229
10	0.237	0.223	0.220	0.227
11	0.237	0.221	0.218	0.225
12	0.238	0.220	0.218	0.225
13	0.238	0.220	0.220	0.226
14	0.237	0.220	0.218	0.225
15	0.238	0.220	0.218	0.225
16	0.238	0.220	0.218	0.225
17	0.238	0.220	0.218	0.225
18	0.238	0.220	0.218	0.225
19	0.238	0.220	0.218	0.225
20	0.239	0.220	0.218	0.226

Lampiran 5

Data Penentuan Waktu Inhibisi Optimum

Ulangan 1

Waktu Inhibisi (menit)	Substart+Enzim (S+E)	S + E (pestisida)	[S + E (pestisida)] - [(S+E)]
2	0.208	0.896	0.588
4	0.335	1.008	0.673
6	0.473	1.165	0.692
8	0.496	1.215	0.714
10	0.439	1.150	0.711
12	0.443	1.155	0.712
14	0.451	1.164	0.713

Ulangan 2

Waktu Inhibisi (menit)	Substart+Enzim (S+E)	S + E (pestisida)	[S + E (pestisida)] - [(S+E)]
2	0.187	0.736	0.549
4	0.207	0.843	0.636
6	0.210	0.862	0.652
8	0.221	0.894	0.673
10	0.215	0.890	0.675
12	0.264	0.942	0.678
14	0.272	0.950	0.678

Ulangan 3

Waktu Inhibisi (menit)	Substart+Enzim (S+E)	S + E (pestisida)	[S + E (pestisida)] - [(S+E)]
2	0.137	0.648	0.511
4	0.189	0.754	0.565
6	0.247	0.827	0.580
8	0.267	0.865	0.598
10	0.278	0.879	0.601
12	0.281	0.883	0.602
14	0.284	0.886	0.602

Rata-rata Ulangan 1, 2, 3

Waktu Inhibisi (menit)	Selisih Intensitas			Rata-rata
	u1	u2	u3	
2	0.588	0.549	0.511	0.549
4	0.673	0.636	0.565	0.625
6	0.692	0.652	0.580	0.641
8	0.714	0.673	0.598	0.662
10	0.711	0.675	0.601	0.662
12	0.712	0.678	0.602	0.664
14	0.713	0.678	0.602	0.664

Lampiran 6

Data Respon Biosensor Asetilkolinesterase Immobil yang Terinhibisi oleh Pestisida Dimetoat dengan Variasi Konsentrasi 10-2000 ppb (**ulangan 1**), Lamda 620, Konsentrasi Subtrat 50 mM, Waktu Respon Substrat 10 menit, dan Waktu Inhibisi 8 menit

Konsentrasi (ppb)	Absorbansi		I %
	S+E	S+E (Pestisida)	
10	0.395	0.740	34.500
50	0.423	0.780	35.700
100	0.559	0.961	40.200
250	0.641	1.194	55.300
500	0.673	1.252	57.900
1000	0.722	1.325	60.300
2000	0.814	1.365	55.100

Data Respon Biosensor Asetilkolinesterase Immobil yang Terinhibisi oleh Pestisida Dimetoat dengan Variasi Konsentrasi 10-2000 ppb (**ulangan 2**), Lamda 620, Konsentrasi Subtrat 50 mM, Waktu Respon Substrat 10 menit, dan Waktu Inhibisi 8 menit

Konsentrasi (ppb)	S+E	S+E (Pestisida)	I %
10	0.364	0.629	26.500
50	0.395	0.668	27.300
100	0.436	0.772	33.600
250	0.471	0.923	45.200
500	0.524	1.028	50.400
1000	0.587	1.182	59.500
2000	0.638	1.242	60.400

Data Respon Biosensor Asetilkolinesterase Immobil yang Terinhibisi oleh Pestisida Dimetoat dengan Variasi Konsentrasi 10-2000 ppb (**ulangan 3**), Lamda 620, Konsentrasi Subtrat 50 mM, Waktu Respon Substrat 10 menit, dan Waktu Inhibisi 8 menit

Konsentrasi (ppb)	S+E	S+E (Pestisida)	I %
10	0.334	0.568	23.400
50	0.368	0.641	26.800
100	0.380	0.705	32.500
250	0.402	0.839	43.700
500	0.505	1.032	52.700
1000	0.654	1.240	58.600
2000	0.709	1.285	57.600

Lampiran 7

Data Respon Biosensor Asetilkolinesterase terhadap Pestisida Dimetoat

Konsentrasi [I] (ppb)	Log Konsentrasi	I %			Rata-rata I%
		u1	u2	u3	
10	1	34.500	26.500	23.400	28.133
50	1.699	35.700	27.300	26.800	29.933
100	2	40.200	33.600	32.500	35.433
250	2.398	55.300	45.200	43.700	48.067
500	2.699	57.900	50.400	52.700	53.667
1000	3	60.300	59.500	58.600	59.467
2000	3.301	55.100	60.400	57.600	57.700



Lampiran 8

Data Respon Biosensor Asetilkolinesterase Immobil yang Terinhibisi oleh Pestisida Propuksur dengan Variasi Konsentrasi 5 - 250 ppb (**ulangan 1**), Lamda 620, Konsentrasi Subtrat 50 mM, Wwaktu Respon Subtrat 10 menit, dan Waktu Inhibisi 8 menit.

Konsentrasi (ppb)	Absorbansi		I %
	S+E	S+E (Pestisida)	
5	0.286	0.522	25.400
10	0.292	0.561	26.900
25	0.301	0.591	29.000
50	0.375	0.710	33.500
75	0.398	0.779	38.100
100	0.456	0.873	41.700
250	0.504	0.922	41.800

Data Respon Biosensor Asetilkolinesterase Immobil yang Terinhibisi oleh Pestisida Propuksur dengan Variasi Konsentrasi 5 - 250 ppb (**ulangan 2**), Lamda 620, Konsentrasi Subtrat 50 mM, Waktu Respon Subtrat 10 menit, dan Waktu Inhibisi 8 menit.

Konsentrasi (ppb)	S+E	S+E (Pestisida)	I %
5	0.243	0.466	22.300
10	0.245	0.479	23.400
25	0.247	0.531	28.400
50	0.272	0.566	29.400
75	0.344	0.683	33.900
100	0.368	0.734	36.600
250	0.483	0.828	34.500

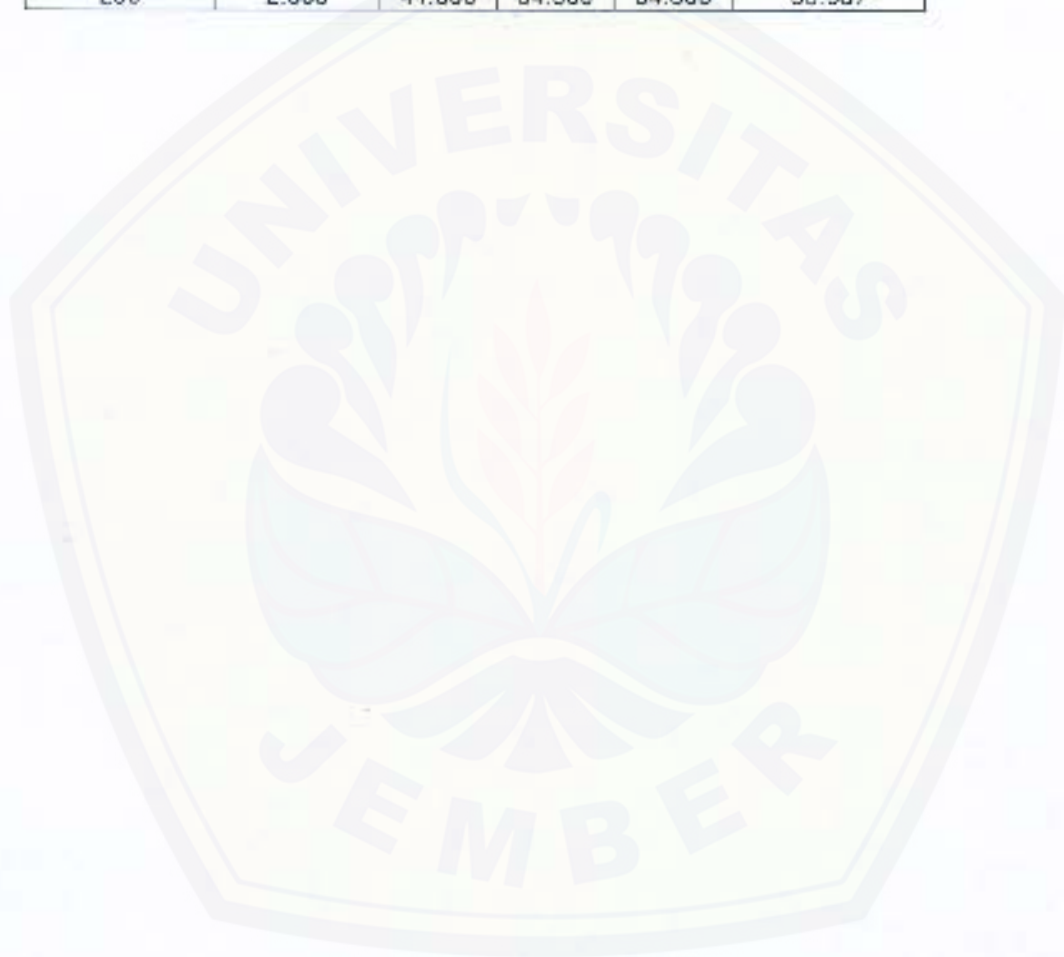
Data Respon Biosensor Asetilkolinesterase Immobil yang Terinhibisi oleh Pestisida Propuksur dengan Variasi Konsentrasi 5 - 250 ppb (**ulangan 3**), Lamda 620, Konsentrasi Subtrat 50 mM, Waktu Respon Subtrat 10 menit, dan Waktu Inhibisi 8 menit.

Konsentrasi (ppb)	S+E	S+E (Pestisida)	I %
5	0.237	0.442	20.500
10	0.245	0.463	21.800
25	0.286	0.529	24.300
50	0.304	0.585	28.100
75	0.381	0.711	33.000
100	0.423	0.752	32.900
250	0.457	0.803	34.600

Lampiran 9

Data Respon Biosensor Asetilkolinesterase terhadap Pestisida Propuksur

Konsentrasi [I] (ppb)	Log Konsentrasi	I %			Rata-rata
		u1	u2	u3	
5	0.699	25.400	22.300	20.500	22.733
10	1	26.900	23.400	21.800	24.033
25	1.398	29.000	28.400	24.300	27.233
50	1.699	33.500	29.400	28.100	30.333
75	1.875	38.100	33.900	33.000	35.000
100	2	41.700	36.600	32.900	37.067
250	2.398	41.800	34.500	34.600	36.967



Lampiran 10

Perhitungan Limit Deteksi

1. Pestisida Dimetoat

a. Kurva Konsentrasi

Diketahui: $Y = 0,0855x + 26,629$

Konsentrasi	y	\hat{y}	$y - \hat{y}$	$ y - \hat{y} ^2$
1	28,133	26,715	-1,418	2,010724
50	29,933	30,904	0,971	0,942841
100	35,433	35,179	-0,254	0,064516
250	48,067	48,004	-0,063	0,003969
500	53,667	69,379	15,712	246,866944
1000	59,467	112,129	52,662	2773,286244
2000	57,700	197,629	139,929	19580,12504
Jumlah =				22603,30028

$$S_{y/x} = \left[\frac{22603,30028}{7-2} \right]^{\frac{1}{2}} = 67,23585395$$

$$Y = Y_B + 3 S_B$$

$$Y = 26,629 + 3 (67,23585395)$$

$$Y = 228,3365618$$

$$Y = 0,0855x + 26,629$$

$$228,3365618 = 0,0855x + 26,629$$

$$x = 2359,15277$$

b. Kurva Log Konsentrasi

Diketahui : $Y = 23,54x - 10,223$

Log Konsentrasi	y	\hat{y}	$y - \hat{y}$	$ y - \hat{y} ^2$
1	28,133	13,317	-14,816	219,513856
1,699	29,933	29,771	-0,162	0,026095172
2	35,433	36,857	1,424	2,027776
2,369	48,067	45,543	-2,524	6,369263588
2,699	53,667	52,605	-1,062	1,127291828
3	59,467	60,397	0,930	0,8649
3,301	57,700	67,483	9,783	95,69808885
Jumlah =				325,6272714

$$S_{y/x} = \left[\frac{325,6272714}{7-2} \right]^{1/2} = 8,070034342$$

$$Y = Y_B + 3 S_B$$

$$Y = -10,223 + 3 (8,070034342)$$

$$Y = 13,98710303$$

$$Y = 23,54x - 10,223$$

$$13,98710303 = 23,54x - 10,223$$

$$\text{Log } x = 1,028466569$$

$$x = 10,67742597$$

2. Pestisida Propuksur

a. Kurva Konsentrasi

Diketahui $Y = 0,1523x + 22,673$

Konsentrasi	y	\hat{y}	$y - \hat{y}$	$ y - \hat{y} ^2$
5	22,733	23,435	0,701	0,49210225
10	24,033	24,196	0,163	0,026569
25	27,233	26,481	-0,753	0,56625625
50	30,333	30,288	-0,045	0,002025
75	35,000	34,096	-0,904	0,81812025
100	37,087	37,903	0,836	0,698896
250	36,967	60,748	23,781	565,535961
		Jumlah =		568,1399298

$$S_{y/x} = \left[\frac{568,1399298}{7-2} \right]^{1/2} = 10,65964286$$

$$Y = Y_B + 3 S_B$$

$$Y = 22,673 + 3 (10,65964286)$$

$$Y = 54,65192859$$

$$Y = 0,1523x + 22,673$$

$$54,65192859 = 0,1523x + 22,673$$

$$x = 209,9732672$$

b. Kurva Log Konsentrasi

Diketahui $Y = 10,929x + 13,605$

Log Konsentrasi	y	\hat{y}	$y - \hat{y}$	$ y - \hat{y} ^2$
0,699	22,733	21,244	-1,489	2,2160163
1	24,033	24,534	0,501	0,251001
1,398	27,233	28,884	1,651	2,724949151
1,699	30,333	32,173	1,840	3,386965418
1,875	35,000	34,097	-0,903	0,815634766
2	37,067	35,463	-1,604	2,572816
2,398	38,967	39,813	2,846	8,098247531
		Jumlah =		20,06563016

$$S_{y/x} = \left[\frac{20,06563016}{7 - 2} \right]^{1/2} = 2,00327882$$

$$Y = Y_H + 3 S_H$$

$$Y = 13,605 + 3 (2,00327882)$$

$$Y = 19,61483646$$

$$Y = 10,929x + 13,605$$

$$19,61483646 = 10,929x + 13,605$$

$$\text{Log}x = 0,549898111$$

$$x = 3,547301573$$

Lampiran 11

Perhitungan Reprodusibilitas

$$SD = \sqrt{\frac{(a1)^2 + (a2)^2 + (a3)^2}{n-1}}$$

$$Kv = \left[\frac{SD}{x} \right] \times 100\%$$

Dimana a = selisih signal pengukuran dengan signal rata-rata

SD = Standar Deviasi

Kv = Koefisien variasi

x = signal rata-rata

a. Pestisida Dimetoat

$$\begin{aligned} 10 \text{ ppb: } SD &= \sqrt{\frac{(6,367)^2 + (1,633)^2 + (4,733)^2}{3-1}} \\ &= \sqrt{32,8033335} \\ &= 5,727419445 \\ Kv &= \frac{5,727419445}{28,133} \times 100\% = 20,358\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 50 \text{ ppb: } SD &= \sqrt{\frac{(5,767)^2 + (2,633)^2 + (3,133)^2}{3-1}} \\ &= \sqrt{25,00333339} \\ &= 5,000333339 \\ Kv &= \frac{5,000333339}{29,933} \times 100\% = 16,705\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 100 \text{ ppb: } SD &= \sqrt{\frac{(4,767)^2 + (1,833)^2 + (2,933)^2}{3-1}} \\ &= \sqrt{17,34333335} \\ &= 4,164532807 \\ Kv &= \frac{4,164532807}{35,433} \times 100\% = 11,753\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 250 \text{ ppb;} \quad SD &= \sqrt{\frac{(7,233)^2 + (2,867)^2 + (4,367)^2}{3-1}} \\
 &= \sqrt{39,8033335} \\
 &= 6,30898831 \\
 K_v &= \frac{6,30898831}{48,067} \times 100\% = 13,125\%
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 500 \text{ ppb;} \quad SD &= \sqrt{\frac{(4,233)^2 + (3,267)^2 + (0,967)^2}{3-1}} \\
 &= \sqrt{14,7633335} \\
 &= 3,842308356 \\
 K_v &= \frac{3,842308356}{53,667} \times 100\% = 7,159\%
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 1000 \text{ ppb;} \quad SD &= \sqrt{\frac{(0,833)^2 + (0,033)^2 + (0,867)^2}{3-1}} \\
 &= \sqrt{0,36166675} \\
 &= 0,601387354 \\
 K_v &= \frac{0,601387354}{59,467} \times 100\% = 1,011\%
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 2000 \text{ ppb;} \quad SD &= \sqrt{\frac{(2,6)^2 + (2,7)^2 + (0,1)^2}{3-1}} \\
 &= \sqrt{7,030} \\
 &= 2,651414717 \\
 K_v &= \frac{2,651414717}{57,700} \times 100\% = 4,595\%
 \end{aligned}$$

b. Pestisida Propuksur

$$\begin{aligned}
 5 \text{ ppb;} \quad SD &= \sqrt{\frac{(2,667)^2 + (0,433)^2 + (2,233)^2}{3-1}} \\
 &= \sqrt{6,1433335} \\
 &= 2,478574893 \\
 Kv &= \frac{2,478574893}{22,733} \times 100\% = 10,902\%
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 10 \text{ ppb;} \quad SD &= \sqrt{\frac{(2,867)^2 + (0,633)^2 + (2,233)^2}{3-1}} \\
 &= \sqrt{6,8033335} \\
 &= 2,608320053 \\
 Kv &= \frac{2,608320053}{24,033} \times 100\% = 10,853\%
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 25 \text{ ppb;} \quad SD &= \sqrt{\frac{(1,767)^2 + (1,167)^2 + (2,933)^2}{3-1}} \\
 &= \sqrt{6,5433335} \\
 &= 2,557994038 \\
 Kv &= \frac{2,557994038}{27,233} \times 100\% = 9,393\%
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 50 \text{ ppb;} \quad SD &= \sqrt{\frac{(3,167)^2 + (0,933)^2 + (2,233)^2}{3-1}} \\
 &= \sqrt{7,9433335} \\
 &= 2,818392006 \\
 Kv &= \frac{2,818392006}{30,333} \times 100\% = 9,292\%
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 75 \text{ ppb;} \quad SD &= \sqrt{\frac{(3,1)^2 + (1,1)^2 + (2,0)^2}{3-1}} \\
 &= \sqrt{7,41} \\
 &= 2,722131518
 \end{aligned}$$

$$Kv = \frac{2,722131518}{35,0} \times 100\% = 7,778\%$$

100 ppb;

$$SD = \sqrt{\frac{(4,633)^2 + (0,467)^2 + (4,167)^2}{3-1}}$$
$$= \sqrt{19,5233335}$$
$$= 4,418521642$$

$$Kv = \frac{4,418521642}{37,067} \times 100\% = 11,920\%$$

250 ppb;

$$SD = \sqrt{\frac{(4,833)^2 + (2,467)^2 + (2,367)^2}{3-1}}$$
$$= \sqrt{17,5233335}$$
$$= 4,18608809$$

$$Kv = \frac{4,18608809}{36,967} \times 100\% = 11,324\%$$

Lampiran 12

Perhitungan Penentuan Sampel

1. Pestisida Dimetoat

a. Kurva Konsentrasi

$$Y = 0,0855x + 26,629$$

$$46,533 = 0,0855x + 26,629$$

$$x = \frac{46,533 - 26,629}{0,0855}$$

$$x = 232,7953216$$

$$\% K = \frac{250 - 232,7953216}{250} \times 100\%$$

$$\% K = 6,881\%$$

b. Kurva Log Konsentrasi

$$Y = 23,54x - 10,223$$

$$46,533 = 23,54x - 10,223$$

$$x = \frac{46,533 + 10,223}{23,54}$$

$$\text{Log } x = 2,41104503$$

$$x = 257,6588296$$

$$\% K = \frac{250 - 257,6588}{250} \times 100\%$$

$$K = 3,063 \%$$

2. Pestisida Propoksur

a. Kurva Konsentrasi

$$Y = 0,1523x + 22,673$$

$$31,934 = 0,1523x + 22,673$$

$$x = \frac{31,934 - 22,673}{0,1523}$$

$$x = 60,80761655$$

$$\% K = \frac{50 - 60,80761655}{50} \times 100\%$$

$$\% K = 21,615 \%$$

b. Kurva Log Konsentrasi

$$Y = 10,929x + 13,605$$

$$31,934 = 10,929x + 13,605$$

$$x = \frac{31,934 - 13,605}{10,929}$$

$$\text{Log } x = 1,67709763$$

$$x = 47,54420941$$

$$\% K = \frac{50 - 47,54420}{50} \times 100\%$$

$$K = 4,911 \%$$