

# STUDI PENGGUNAAN ELEKTRODA SELEKTIF AMONIA DALAM PENENTUAN KONSTANTA DISOSIASI UREA AMIDOHIDROLASE YANG BERASAL DARI *Canavalia ensiformis*

Nova Yuliasari

**Abstrak :** Penelitian ini dilakukan untuk melihat kinerja elektroda selektif amonia dalam menentukan konstanta disosiasi reaksi enzimatik. Penentuan ini dilakukan dengan menganalisis konsentrasi amonia yang dibebaskan dari reaksi hidrolisis urea sebagai substrat dengan adanya enzim urea amidohidrolase. Reaksi hidrolisis urea yang berlangsung terpisah dari proses pengukuran ini dijalankan pada temperatur 40°C selama 4 menit menggunakan pH 7,5. Pengukuran konsentrasi amonia di larutan uji yang mengandung konsentrasi substrat  $10^{-1}$  M- $10^{-3}$  M dan  $5 \cdot 10^{-4}$  M- $10^{-4}$  M masing-masing menggunakan rentang persamaan Nernst  $10^{-2}$  M –  $5 \cdot 10^{-5}$  M dan  $10^{-4}$  M - $10^{-5}$  M. Pengukuran konsentrasi ammonia di larutan kontrol menggunakan rentang persamaan Nernst  $10^{-5}$  M- $10^{-6}$  M. Metode yang diusulkan ini menghasilkan konstanta disosiasi urea amidohidrolase yang berasal dari *Canavalia ensiformis* sebesar  $4,28 \cdot 10^{-3}$  M, cukup dekat dengan literatur yaitu  $4 \cdot 10^{-3}$  M. Kecepatan reaksi maksimum yang didapat adalah  $9,62 \cdot 10^{-5}$  M/menit.

**Kata kunci :** urea amidohidrolase, konstanta disosiasi, elektroda selektif ammonia

**Abstract :** This investigation was done to see the performance of ammonia selective electrode in determination of dissociation constant from enzymatic reaction. This determination was done by measurement of ammonia content liberated from hydrolyzing urea as substrate in presence of urea amidohidrolase as enzyme. This reaction which separate from its determination was conducted at the temperature 40°C, at pH 7,5. during 4 minutes. Measurement of ammonia content in test solution which substrate concentration were  $10^{-1}$  M- $10^{-3}$  M and  $5 \cdot 10^{-4}$  M- $10^{-4}$  M, each used Nernst equation range  $10^{-2}$  M –  $5 \cdot 10^{-5}$  M and  $10^{-4}$  M - $10^{-5}$  M. Meanwhile measurement of ammonia content in control solution used Nernst equation range  $10^{-5}$  M- $10^{-6}$  M. This method suggested resulted dissociation constant of urea amidohidrolase from *Canavalia ensiformis* was  $4,28 \cdot 10^{-3}$  M, from literature  $4 \cdot 10^{-3}$  M. Maximum velocity reaction was  $9,62 \cdot 10^{-5}$  M/minute.

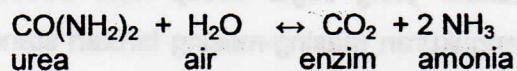
**Key words :** urea amidohidrolase, dissociation constant, ammonia selective electrode.

## PENDAHULUAN

Konstanta disosiasi dari suatu reaksi yang dikatalisis enzim menunjukkan beberapa hal, yaitu : substrat dengan harga konstanta terendah memiliki afinitas tertinggi terhadap enzim; dan bila mengetahui harga konstanta tersebut kita bias

mengatur kondisi dimana konsentrasi substrat jauh lebih besar daripada harga konstanta agar didapat kecepatan reaksi maksimum. Dengan membandingkan harga konstanta ini pun kita dapat mengetahui apakah enzim berasal dari organisme yang berbeda dari organisme yang sama (Segel,

1976). Penelitian ini dilakukan untuk menentukan harga konstanta disosiasi enzim urea amidohidrolase. Enzim ini mengkatalisis hidrolisis substrat urea menjadi produk ammonia dan karbon dioksida sesuai reaksi :



Jaringan tumbuhan yang paling kaya akan enzim ini adalah *Canavalia ensiformis*, dimana kandungan enzim ini mencapai 0,15 % berat kering (Boyer, 1960).

Beberapa jenis elektroda dapat digunakan untuk penentuan ammonia atau dalam bentuk amoniumnya. Jenis yang pertama adalah, elektroda gelas ion amonium. Elektroda ini relative murah namun hanya baik diaplikasikan untuk air dengan kemurnian tinggi karena ada gangguan dari ion-ion logam alkali (Midgley, 1991). Jenis kedua adalah elektroda ammonia berongga udara. Konstruksi elektroda ini menyebabkan tidak ada kontak langsung dengan cairan contoh sehingga tidak ada spesi yang mengganggu. Pengukuran (Camman, 1979), namun elektroda ini penggunaannya kurang praktis (Medgley, 1991). Jenis ketiga adalah electrode urea amidohidrolase, namun dalam penggunaannya membrane enzim harus disimpan dalam temperature 4° C dan tidak stabil lagi setelah beberapa bulan (Pettersson, 1988). Jenis ke empat adalah electrode selektif ammonia. Beberapa kelebihan electrode keempat ini antara lain; lapisan elektrolit elektroda tidak perlu selalu diganti sesudah tiap penentuan, electrode

dapat secara langsung dicelupkan dalam larutan contoh dan tidak memerlukan perlengkapan khusus sebagai wadah larutan contoh, kemungkinan electrode pH yang berada di bagian dalam electrode mengalami kekeringan dapat sangat dihindari, kemudian ketipisan lapisan elektrolit dapat diatur dengan mudah. Elektroda ini pun bebas dari gangguan kation, anion dan gas-gas selain ammonia (Bailey, 1975). Elektroda ke empat inilah yang digunakan penelitian untuk menentukan konsentrasi ammonia yang disebabkan dari reaksi hidrolisis.

Penelitian ini melakukan pemisahan antara reaksi hidrolisis substrat dengan pengukuran produk reaksi dengan elektroda. Hal ini memungkinkan reaksi tetap berjalan pada pH optimum dan temperatur yang dibutuhkan. Reaksi hidrolisis ini dijalankan sesuai kondisi pada literatur yaitu optimum pada pH 7,5 selama 4 menit (Fruton, 1953). Temperatur 50° C masih menunjukkan kenaikan aktivitas enzim ini (West, 1959), sehingga dilakukan reaksi pada 40° C.

Bila pengukuran dijalankan bersamaan dengan proses hidrolisis maka kekurangan pertama adalah batas deteksi electrode menjadi kurang baik karena pengukuran berlangsung pada pH optimum yang relative rendah sehingga banyak ammonia berubah menjadi amonium, kekurangan kedua temperatur optimum hidrolisis lebih tinggi dari rentang operasional electrode. Selain itu juga metode yang diusulkan ini diharapkan dapat

digunakan untuk reaksi enzimatik substrat lain asalkan membebaskan produk berupa ammonia, walaupun membutuhkan pH hidrolisa yang rendah dan temperatur inkubasi yang tinggi.

## METODOLOGI PENELITIAN

### Alat dan Bahan :

Peralatan yang digunakan yaitu Elektrode selektif ammonia (Methrom 6.506.010), Elektrode pH (Methrom 6.0202.200), Potensiometer (Methrom tipe 692 pH), Termostat (Mettler), Stop watch dan pengaduk magnetik.

Bahan yang digunakan antara lain: urea amidohidrolase (Merck), urea (Merck), Tris hidroksi metal amino metana (Fisher), asam sulfat (Merck), asam klorida (Merck), Natrium hidroksida (Merck), ammonium klorida (Merck), air bebas mineral.

### Penyiapan Elektroda

Elektrode ammonia disiapkan dengan cara menyuntikkan larutan pengisi berupa  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,1 M ke bagian dalam elektroda sebanyak 2,5 mL. Setelah penyuntikkan electrode direndam dengan larutan  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,05 M selama 30 menit. Penyimpanan electrode sehari-hari dilakukan dengan merendam elektroda dalam larutan  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,05 M tanpa penambahan NaOH untuk menghindari penguapan. Seluruh pengukuran dengan electrode dilakukan pada temperatur 25° C. konsentrasi  $\text{NH}_4\text{Cl}$  standar nilainya sama dengan konsentrasi ammonia ( $\text{NH}_3$ ) yang terdeteksi.

### Pembuatan Larutan Standar

Dari larutan sediaan  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,1 M dibuat larutan intermediat dengan konsentrasi  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  dan  $10^{-6}$  M. dari larutan intermediat ini dibuat larutan standar yang segar setiap hari. Sebelum pengukuran masing-masing larutan standar dialiokot ke dalam labu takar 25 mL dan dibasakan dengan penambahan NaOH 10 M sebanyak 0,2 mL. Larutan yang telah ditepatkan volumenya menggunakan air bebas mineral di labu takar 25 mL tersebut akan memiliki pH 12 dengan konsentrasi  $10^{-2}$ ,  $5 \cdot 10^{-3}$ ,  $10^{-3}$ ,  $5 \cdot 10^{-4}$ ,  $10^{-4}$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $5 \cdot 10^{-7}$  dan  $10^{-7}$  M.

Komponen-komponen yang ada di larutan standar diusahakan sama dengan komponen larutan contoh, sehingga dalam larutan standar juga ditambahkan 1 mL HCl 1 M dan 2 mL buffer tris hidroksi metal amino metana sulfat pH 7,5.

### Proses Hidrolisis Substrat

Larutan enzim aktif dibuat dengan menimbang 25 mg enzim kering yang berasal dari *Canavalia ensiformis*, (dari kemasan pabrik Merck) dilarutkan dalam buffer tris hidroksi metal amino metana pH 7,5 dalam labu takar 50 mL membentuk konsentrasi enzim 0,5 mg/mL

Buffer dibuat dengan cara menambahkan larutan  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $10^{-2}$  M kedalam 50 mL tris hidroksi metal amino metana  $10^{-2}$  M hingga membentuk pH 7,5 dalam volume 100 mL. Substrat dilarutkan dalam buffer tris hidroksi metal amino metana pH 7,5 membentuk konsentrasi

$2 \cdot 10^{-1}$ ;  $10^{-1}$ ;  $2 \cdot 10^{-2}$ ;  $1.4 \cdot 10^{-2}$ ;  $10^{-4}$ ;  $10^{-2}$ ;  $8 \cdot 10^{-3}$ ;  $6 \cdot 10^{-3}$ ;  $2 \cdot 10^{-3}$ ;  $10^{-3}$  dan  $2 \cdot 10^{-4}$  M.

Larutan enzim dan substrat masing-masing dilakukan pra inkubasi selama 5 menit di tabung reaksi dalam thermostat. Larutan uji dibuat dengan menambahkan 1 mL larutan enzim secara kuantitatif ke dalam masing-masing 1 mL larutan substrat kemudian dinkubasi pada suhu  $40^{\circ}$  C. Dengan demikian konsentrasi 2 mL substrat di larutan inkubasi sebesar  $10^{-1}$ ;  $5 \cdot 10^{-2}$ ;  $10^{-2}$ ;  $7 \cdot 10^{-3}$ ;  $5 \cdot 10^{-3}$ ;  $4 \cdot 10^{-3}$ ;  $3 \cdot 10^{-3}$ ;  $10^{-3}$ ;  $5 \cdot 10^{-4}$  dan  $10^{-4}$  M. Konsentrasi larutan enzim dalam larutan yang diinkubasi menjadi 0,25 mg/mL. Setelah inkubasi selama menit, segera enzim dalam larutan uji dimatikan aktivitasnya dengan penambahan 1 mL HCl 1 M.

Larutan control merupakan larutan substrat dengan variasi konsentrasi yang sama dengan larutan uji. Larutan control dibuat dengan menambahkan larutan enzim inaktif berupa 2 mL larutan enzim : HCl 1 M (1 : 1) ke dalam masing-masing larutan substrat yang telah dilakukan pra inkubasi bersamaan dengan larutan uji, penambahan ini dilakukan tepat setelah larutan uji ditambahkan 1 mL HCl 1 M.

### Pengukuran konsentrasi Produk

Larutan uji dan control yang sudah inaktif dalam tabung reaksi kemudian dipindahkan secara kuantitatif ke labu takar 25 mL. Sebelum pengukuran, larutan contoh ditambahkan 0,2 mL NaOH 10 M dan ditempatkan volumenya hingga tanda batas dengan air bebas mineral.

Pengukuran konsentrasi ammonia di larutan uji yang mengandung konsentrasi substrat  $10^{-1}$  M dan  $10^{-3}$  M menggunakan persamaan rentang elektroda  $10^{-2}$  M –  $5 \cdot 10^{-5}$  M, sedangkan konsentrasi substrat  $5 \cdot 10^{-4}$  M dan  $10^{-4}$  M menggunakan rentang elektroda  $10^{-4}$  M -  $10^{-5}$  M.

Pengukuran konsentrasi ammonia dilarutan control menggunakan persamaan rentang elektroda  $10^{-5}$  M -  $10^{-6}$  M. setiap proses hidrolisis dan inaktivasi dilakukan secara triplo sehingga didapat hasil pengukuran dari masing-masing kalibrasi standarnya. Kalibrasi larutan standar pengulangan I digunakan untuk menentukan konsentrasi larutan uji dan control pengulangan I dan seterusnya hingga pengulangan III.

### Analisa Data

Persamaan Nernst dari elektroda ammonia ini adalah :

$$E = E' - 2,303RT / nF \log [\text{NH}_3] \quad (1)$$

Keterangan :

E = Potensial sel

E' = Konstanta

R = Tetapan gas (8,314 J/K.mol)

F = Tetapan Faraday (96.500)

T = Temperatur (Kelvin)

Persamaan Nernst digunakan untuk kurva kalibrasi linier. Konstanta disosiasi enzim ditentukan dengan menggunakan rumus Lineweaver Burk, yaitu: (Wirahadikusumah, 1983) :

$$1/V = 1/(V_{maks}) + (Kd/V_{maks}) (1 / ([S]) \quad (2)$$

Keterangan :

$V$  = Kecepatan reaksi

$V_{maks}$  = Kecepatan reaksi maks.

$Kd$  = Konstantas disosiasi

$[S]$  = Konstanta substrat

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Inaktivasi Enzim

Inaktivasi enzim larutan uji dalam penelitian ini dilakukan untuk menghentikan reaksi sehingga dapat dipertanggung jawabkan kecepatan setelah waktu yang ditentukan tercapai. Inaktivasi pada larutan control waktu untuk menjamin bahwa konsentrasi produk yang akan diperhitungkan tidak berasal dari reaksi non enzimatik. Inaktivasi dapat dilakukan dengan pemanasan atau pembasaan yang ekstrim, hal ini tidak dilakukan karena dapat mengakibatkan menguapnya ammonia sehingga dipilih inaktivasi dengan HCl. Selisih yang didapat cukup besar antara konsentrasi ammonia di larutan uji dan larutan control, yaitu :

Rata-rata triplo pengukuran ammonia di larutan control untuk konsentrasi substrat terendah ( $10^{-4}$  M) adalah  $1,05 \cdot 10^{-6}$  sedangkan rata-rata triplo ammonia dilarutan ujinya adalah  $0,11 \cdot 10^{-4}$  M.

Rata-rata triplo pengukuran ammonia di larutan control untuk konsentrasi substrat tertinggi ( $10^{-1}$  M) adalah  $1,50 \cdot 10^{-6}$  sedangkan rata-rata triplo ammonia dilarutan ujinya adalah  $3,63 \cdot 10^{-4}$  M.

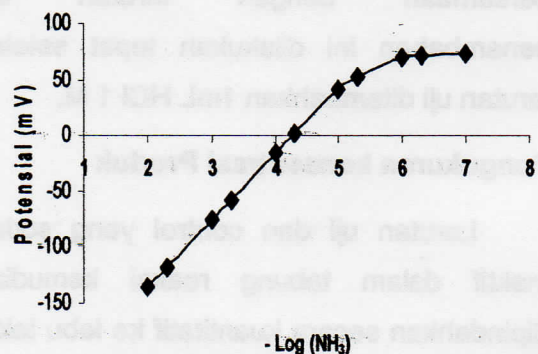
Data ini memperlihatkan proses inaktivasi berhasil baik. Adanya ion hidronium dan di HCl selain dapat menyerang gugus sulfidril enzim, juga dapat menyebabkan terbukanya lipatan karakteristik enzim karena putusannya ikatan-ikatan polipeptida sehingga aktivitas katalitiknya pun rusak (Lehninger, 1982). Anion CT juga dilaporkan menghambat kerja enzim ini (Boyer, 1960).

### Pengukuran Konsentrasi Produk

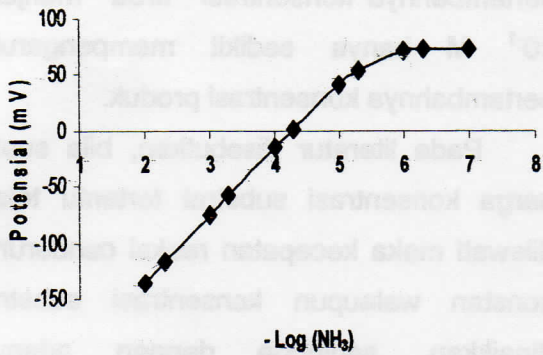
Larutan standard an cuplikan pada penelitian ini telah dibasakan dengan 0,2 mL NaOH 0,1 M sehingga memiliki pH 12. Reaksi kesetimbangan  $NH_4Cl \leftrightarrow NH_3 + Cl^-$

Akan 100% bergeser ke arah  $NH_3$  pada pH diatas 11. Seluruh ion ammonium pada  $NH_4Cl$  standar akan berubah menjadi  $NH_3$  (ammonia).

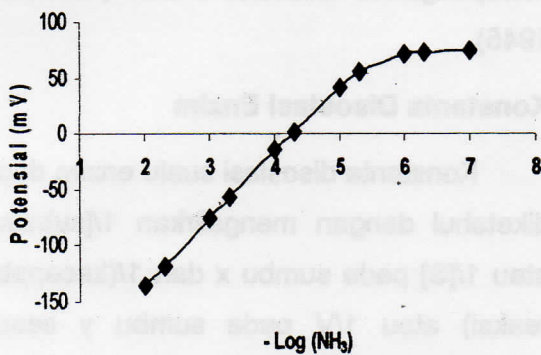
Seluruh proses hidrolisis dan inaktivasi dilakukan secara triplo sehingga masing-masing pengulangan memiliki kurva kalibrasi standar tersendiri sesuai gambar 1, gambar 2 dan gambar 3.



Gambar 1. Kurva kalibrasi standar Pengulangan I



**Gambar 2.** Kurva kalibrasi standar Pengulangan II



**Gambar 3.** Kurva kalibrasi standar Pengulangan III

Pengukuran konsentrasi ammonia dilarutan cuplikan akan menghasilkan informasi yang lebih tepat bila potensial cuplikan yang terbaca dialurkan pada rentang konsentrasi yang tidak luas jaraknya. Masing-masing data dihitung berdasarkan rentang konsentrasi yang sesuai.

Konsentrasi ammonia di larutan uji pada konsentrasi substrat  $10^{-3}$  M sehingga  $10^{-3}$  M menggunakan persamaan rentang elektroda  $10^{-2}$  M –  $5 \cdot 10^{-5}$  M :

Pengulangan I :

$$E = -256,34 - 60,05 \log [\text{NH}_3], R = 0,9999$$

Pengulangan II :

$$E = -254,68 - 59,51 \log [\text{NH}_3], R = 0,9999$$

Pengulangan III :

$$E = -256,21 - 60,29 \log [\text{NH}_3], R = 0,9999$$

Konsentrasi ammonia di larutan uji pada konsentrasi substrat  $5 \cdot 10^{-4}$  M sehingga  $10^{-4}$  M menggunakan persamaan rentang elektroda  $10^{-4}$  M –  $10^{-5}$  M :

Pengulangan I :

$$E = -241,79 - 56,58 \log [\text{NH}_3], R = 0,9999$$

Pengulangan II :

$$E = -239,00 - 56,00 \log [\text{NH}_3], R = 0,9999$$

Pengulangan III :

$$E = -238,98 - 56,18 \log [\text{NH}_3], R = 0,9999$$

Konsentrasi ammonia di larutan control menggunakan persamaan rentang elektroda  $10^{-5}$  M –  $10^{-6}$  M :

Pengulangan I :

$$E = -99,90 - 28,39 \log [\text{NH}_3], R = 0,9957$$

Pengulangan II :

$$E = -101,17 - 28,99 \log [\text{NH}_3], R = 0,9888$$

Pengulangan III :

$$E = -102,17 - 28,99 \log [\text{NH}_3], R = 0,9888$$

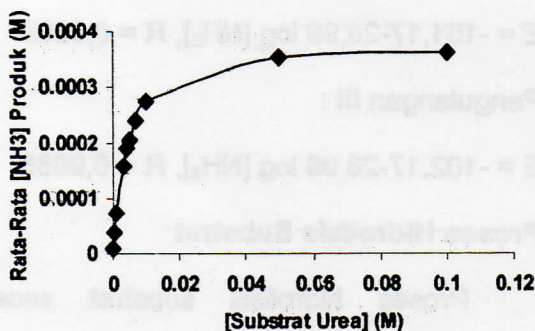
### Proses Hidrolisis Substrat

Proses hidrolisis substrat secara enzimatik pada penelitian ini membutuhkan pH tertentu yaitu pH 7,5 (Fruton, 1953). Aktivitas enzim pada pH tertentu menunjukkan dimana gugus pendonor atau penerima proton sisi katalitik pada keadaan

yang dibutuhkan untuk disosiasi (Lehninger, 1982).

Penelitian ini menggunakan suhu inkubasi 40° C karena menurut West (1959) pada suhu 50° C keaktifan urea amidohidrolase masih naik. Pada suhu terlalu rendah kemantapan enzim tertinggi tetapi aktivitasnya masih rendah, sedangkan pada suhu yang terlalu tinggi aktivitasnya tinggi, tetapi kemantapannya rendah. Temperatur optimum didapat sebelum aktivitas enzim menurun karena mulai terdenaturasi akibat suhu tinggi dimana gaya-gaya ikatan lemah sehingga dapat rusak akibat meningkatnya getaran termal komponen atom-atomnya dan merusak struktur tiga dimensi.

Penelitian hidrolisis dengan konsentrasi substrat urea yang bervariasi ini dikatalisis oleh 0,25 mg/mL enzim. Hubungan antara konsentrasi substrat dalam larutan yang diinkubasi dengan konsentrasi ammonia terukur dapat dilihat pada gambar 4.



**Gambar 4.** Korelasi konsentrasi substrat terhadap konsentrasi produk.

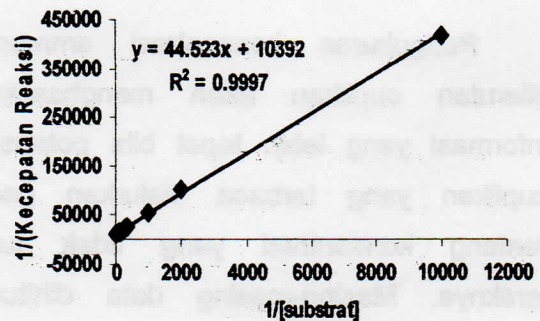
Gambar 4 memperlihatkan bahwa pada konsentrasi substrat  $5 \cdot 10^{-2}$  M dalam larutan uji cenderung konstan, sehingga

bertambahnya konsentrasi urea menjadi  $10^{-1}$  M hanya sedikit mempengaruhi bertambahnya konsentrasi produk.

Pada literatur disebutkan, bila suatu harga konsentrasi substrat tertentu telah dilewati maka kecepatan reaksi cenderung konstan walaupun konsentrasi substrat dinaikkan, sehingga dengan adanya konsentrasi substrat yang jauh lebih pekat akan kecil mempengaruhi atau tidak mempengaruhi aktivitas enzim (Cameron, 1945).

### Konstanta Disosiasi Enzim

Konstanta disosiasi suatu enzim dapat diketahui dengan mengalirkan  $1/[\text{substrat}]$  atau  $1/[S]$  pada sumbu x dan  $1/(\text{kecepatan reaksi})$  atau  $1/V$  pada sumbu y sesuai persamaan Lineweaver-Burk yang dihasilkan pada penelitian ini sesuai gambar 5.



**Gambar 5.** Kurva Lineweaver-Burk

Kurva pada gambar 5 memperlihatkan persamaan Lineweaver-Burk  $1/V = 10392 + 44,523 [1/S]$ , sehingga didapat  $V_{\text{maks}}$  atau kecepatan maksimum sebesar  $9,62 \cdot 10^{-5}$  M/mnt dan konstanta disosiasi sebesar  $4,28 \cdot 10^{-3}$  M. Nilai konstanta ini telah mendekati literature yaitu konstanta urea amido-

hidrolase yang berasal dari *Canavalia ensiformis* adalah  $4.10^{-3}$  M (Boyer, 1960). Enzi mini yang berasal dari kacang kedelai dan *Bacillus pasteurii* memiliki nilai konstanta disosiasi masing-masing  $2,5 \cdot 10^{-2}$  M dan  $1.10^{-2}$  M (Boyer, 1960).

## KESIMPULAN

Studi penelitian ini memperlihatkan bahwa:

1. Penentuan konstanta disosiasi urea amidohidrolase dapat dilakukan menggunakan elektroda selektif ammonia, dimana proses hidrolisis dipisah dari proses pengukuran.
2. Pengukuran konsentrasi ammonia di larutan uji dan di larutan control menggunakan peramaan rentang elektroda yang berlainan.
3. Nilai konstanta disosiasi urea amidohidrolase yang berasal dari *Canavalia ensiformis* didapat  $4,28.10^{-3}$  M, cukup dekat dengan literature yaitu  $4.10^{-3}$  M.
4. Kecepatan maksimum reaksi hidrolisis yang didapat adalah  $9,62.10^{-5}$  M/menit.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bailey P.L., 1975, *Performance Characteristics of Gas-Sensing Membran Probes*, *Analyst*, 100, 145-156.
- Boyer P., 1960, *The Enzymes*, Vol 4., Academic Press Inc, New York.
- Cameron, 1945, *A Text Book of Biochemistry*, 6<sup>th</sup> ed., J. A. Churchill Ltd. London.
- Camman K., 1979, *Working with Ion-Selective Electrodes*, Springer-Verlag, Berlin.
- Fruton J.S., 1953, *General Biochemistry*, John Wiley and Sons Inc, New York.
- Lehninger, 1982, *Principle of Biochemistry*, Worth Publishers Inc., New York.
- Midgley D., 1991, *Potentiometric Water Analysis*, 2<sup>nd</sup> ed, John Wiley & Sons, Chicester.
- Petersson B. B., 1988, *Enzymatic Determination of Urea in Diluted Whole Blood by Ammonium Ion Electrode*, *Anal..Chim.Acta*, 209, 239-248.
- Segel I. H., 1976, *Biochemical Calculations*, John Wiley & Sons, New York.
- West E., 1959, *Text Book of Biochemistry*, The Macmilan Co., New York.
- Wirahadikusumah M., 1983, *Biokimia: Protein-Enzim dan Asam Nukleat*, Penerbit ITB, Bandung.