



UNIVERSITAS NEGERI PADANG



KOMISI YUDISIAL RI

## LAPORAN HASIL PENELITIAN PUTUSAN HAKIM YANG BERDIMENSI PELANGGARAN HAM

PUTUSAN HAKIM NO. PERKARA NOMOR:  
17/PID.B/2005/PN.PDG.PENGADILAN NEGERI PADANG TENTANG  
ILLEGAL FISHING

OLEH:  
TIM PENELITI  
PUSAT STUDI HAM UNIVERSITAS NEGERI PADANG

1. Drs. Akmal, M.Si (Pusham)
2. Aldri Frinaldi, SH, M.H (Pusham)
3. Suhelmi Karim Tamin SH. (Pusham)

Asisten Peneliti:

1. Slamet Widodo, SH (Staf Komnas HAM Perwakilan Sumatera Barat)
2. Firdaus, SH (Staf Komnas HAM Perwakilan Sumatera Barat)

MILIK PERPUSTAKAAN UNIV. NEGERI PADANG
DITERIMA TGL : 4 September 2013
SUMBER/HARGA : Rp
KOLEKSI : Ki
INVENTARIS : 144/Ud/2013. p.1 (1)

*DILAKSANAKAN ATAS SURAT PERINTAH KERJA (SPK) NOMOR:  
SPK/KY/VIII/2007 TANGGAL 13 AGUSTUS 2007 ANTARA KOMISI YUDISIAL RI  
DENGAN PUSHAM UNIVERSITAS NEGERI PADANG*

**PUSAT STUDI HAK ASASI MANUSIA  
UNIVERSITAS NEGERI PADANG  
BULAN SEPTEMBER, TAHUN 2007**

MILIK PERPUSTAKAAN  
UNIV. NEGERI PADANG



UNIVERSITAS NEGERI PADANG



KOMISI YUDISIAL RI

## LAPORAN HASIL PENELITIAN PUTUSAN HAKIM YANG BERDIMENSI PELANGGARAN HAM

PUTUSAN HAKIM NO. PERKARA NOMOR:  
17/PID.B/2005/PN.PDG.PENGADILAN NEGERI PADANG TENTANG  
ILLEGAL FISHING

OLEH:  
TIM PENELITI  
PUSAT STUDI HAM UNIVERSITAS NEGERI PADANG

1. Drs. Akmal, M.Si (Pusham)
2. Aldri Frinaldi, SH, M.H (Pusham)
3. Suhelmi Karim Tamin SH, (Pusham)

Asisten Peneliti:

1. Slamet Widodo, SH (Staf Komnas HAM Perwakilan Sumatera Barat)
2. Firdaus, SH (Staf Komnas HAM Perwakilan Sumatera Barat)

*DILAKSANAKAN ATAS SURAT PERINTAH KERJA (SPK) NOMOR:  
/SPK/KY/VIII/2007 TANGGAL 13 AGUSTUS 2007 ANTARA KOMISI YUDISIAL RI  
DENGAN PUSHAM UNIVERSITAS NEGERI PADANG*

**PUSAT STUDI HAK ASASI MANUSIA  
UNIVERSITAS NEGERI PADANG  
BULAN SEPTEMBER, TAHUN 2007**

MILIK PERPUSTAKAAN UNIV. NEGERI PADANG
DITERIMA TGL : 4 September 2013
SUMBER/HARGA: Hd
KOLEKSI Ki
INVENTARIS : 144/Ud/2013. p.1 (0)

MILIK PERPUSTAKAAN  
UNIV. NEGERI PADANG



UNIVERSITAS NEGERI PADANG



KOMISI YUDISIAL RI

## LAPORAN HASIL PENELITIAN PUTUSAN HAKIM YANG BERDIMENSI PELANGGARAN HAM

PUTUSAN HAKIM NO. PERKARA NOMOR:  
17/PID.B/2005/PN.PDG.PENGADILAN NEGERI PADANG TENTANG  
ILLEGAL FISHING

OLEH:  
TIM PENELITI  
PUSAT STUDI HAM UNIVERSITAS NEGERI PADANG

1. Drs. Akmal, M.Si (Pusham)
2. Aldri Frinaldi, SH, M.H (Pusham)
3. Suhelmi Karim Tamin SH. (Pusham)

Asisten Peneliti:

1. Slamet Widodo, SH (Staf Komnas HAM Perwakilan Sumatera Barat)
2. Firdaus, SH (Staf Komnas HAM Perwakilan Sumatera Barat)

MILIK PERPUSTAKAAN UNIV. NEGERI PADANG	
DITERIMA TGL :	4 September 2013
SUMBER/HARGA :	kd
KOLEKSI :	KI
INVENTARIS :	144/kd/2013. p.1 (0)

*DILAKSANAKAN ATAS SURAT PERINTAH KERJA (SPK) NOMOR:  
/SPK/KY/VIII/2007 TANGGAL 13 AGUSTUS 2007 ANTARA KOMISI YUDISIAL RI  
DENGAN PUSHAM UNIVERSITAS NEGERI PADANG*

**PUSAT STUDI HAK ASASI MANUSIA  
UNIVERSITAS NEGERI PADANG  
BULAN SEPTEMBER, TAHUN 2007**

MILIK PERPUSTAKAAN  
UNIV. NEGERI PADANG

## HALAMAN PENGESAHAN

### A. Ketua Peneliti

- a. Nama Lengkap dan Gelar : Drs. Akmal, M.Si  
b. Jenis Kelamin : Laki-Laki  
c. Jabatan : Ketua Pusat Studi Hak Asasi Manusia  
Universitas Negeri Padang (PUSHAM UNP)  
d. Bidang Keahlian : Pengampu Mata Kuliah Hak Asasi Manusia  
e. Program Studi : P.Kewarganegaraan dan Ilmu Administrasi  
Negara  
f. Perguruan Tinggi : Universitas Negeri Padang (UNP)

### B. Tim Peneliti

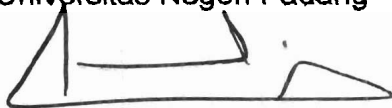
No.	Nama	Bidang Keahlian
1	Drs. Akmal, M.Si	Sarjana Civic/Hukum, S-2 Pengkajian Ketahanan Nasional UI, Dosen Matakuliah HAM, (Penyelesaian S-1 Hukum), Anggota Komnas HAM Perwakilan Sumatera Barat, Ketua PUSHAM UNP, Ketua Forum PUSHAM Perguruan Tinggi Se Sumatera Barat
2	Aldri Frinaldi, SH, M.H	Hukum Ketatanegaraan dan HAM
3	Suhelmi Karim Tamin, SH	Hukum Pidana/Perdata dan HAM

### Asisten Peneliti

No.	Nama	Bidang Keahlian
1	Slamet Widodo, SH	Hukum Pidana, HAM, & Mhs S-2 Ilmu Hukum, dan Staf Komnas HAM Sumbar
2	Firdaus, SH	Hukum Pidana, HAM, & Mhs S-2 Ilmu Hukum, dan Staf Komnas HAM

Padang, 30 September 2007

Mengetahui  
Ketua Pusat Studi Hak Asasi Manusia  
Universitas Negeri Padang



Drs. Akmal, M.Si  
NIP. 131 764 218

Ketua Peneliti



Drs. Akmal, M.Si  
NIP 131 764 218

# LAPORAN HASIL PENELITIAN



MILIK PERPUSTAKAAN	UNIV. NEGERI PADANG
DITERIMA TGL	12-03-2014
SUMBER/HARGA	Hd
KOLEKSI	U
NO. REKAM	591/hd/2014-h.1(U)
KLASIFIKASI	

## KAJIAN SISTEM IDENTIFIKASI SENYAWA BERACUN MENGUNAKAN FENOMENA BIOLUMINISENSI UNTUK BIOSENSOR LINGKUNGAN

Oleh :  
Dr. Ratnawulan, M.Si

DIBIYAI OLEH Dana DIPA DP2M Ditjen Dikti Depdiknas  
SURAT PERJANJIAN NO: 028/SP2H/PP/DP2M/III/2010 Tanggal 1 Maret 2010  
DIREKTORAT JENDERAL PENDIDIKAN TINGGI  
DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL

FAKULTAS MIPA / JURUSAN FISIKA  
UNIVERSITAS NEGERI PADANG  
2011

## Halaman Pengesahan Laporan Akhir

1. Judul : Kajian Sistem Identifikasi Senyawa Beracun Menggunakan Fenomena Bioluminisensi Untuk Biosensor Lingkungan
2. Ketua Peneliti
- a. Nama Lengkap dan Gelar : Dr. Ratnawulan, M.Si
  - b. Jenis Kelamin : Perempuan
  - c. NIP : 196901201993032002
  - d. Pangkat /Golongan : Lektor/IIIc
  - e. Jabatan Struktural : -
  - f. Jabatan Fungsional : Lektor
  - g. Fakultas/Jurusan : FMIPA/ Fisika
  - h. Pusat Penelitian : Universitas Negeri Padang
  - i. Alamat : Jl. Prof. Dr. Hamka Air Tawar Padang
  - j. Telepon/Faks : (0751)443450
  - k. Alamat Rumah : Jl. Barabah No.1 Air Tawar Padang
  - m. Email : [ratna\\_unp@yahoo.com](mailto:ratna_unp@yahoo.com)
3. Jumlah Tim Peneliti : 1 orang
4. Lokasi Penelitian : Laboratorium Fisika Universitas Negeri Padang
5. Kerja Sama dengan Institusi Lain : -
6. Masa Penelitian : 10 bulan
7. Biaya yang Diperlukan : Rp. 21.000.000,- (Duapuluh satu juta rupiah)

Mengetahui,  
Dekan Fakultas MIPA  
Universitas Negeri Padang

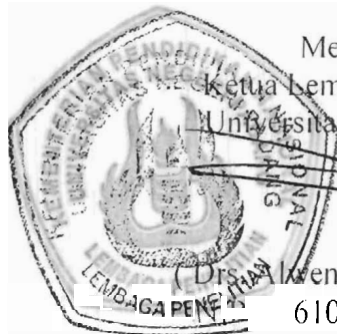


(S. H. Asrul, MA)  
NIP. 195204231976031003

Padang, 2 Februari 2011  
Ketua Tim Pelaksana

( Dr. Ratnawulan, M.Si)  
NIP . 196901201993032002

Mengetahui  
Ketua Lembaga Penelitian,  
Universitas Negeri Padang



( Drs. Iwan Bentri, M.Pd)  
6107221986021002

## RINGKASAN

Pemanfaatan fenomena bioluminisensi dari bakteri *Photobacterium phosphoreum* sangat menarik untuk dikaji. Proses pemancaran cahaya melibatkan senyawa bioaktif yang disebut luciferase dan disingkat dengan LBPP. Salah satu pemanfaatannya adalah sebagai bahan sensor untuk mendeteksi keberadaan senyawa beracun di alam. Meskipun peneliti telah melakukan kajian eksperimen terhadap perilaku perubahan intensitas cahaya dari bakteri akibat keberadaan senyawa beracun, namun kenapa dan bagaimana senyawa tersebut dapat mempengaruhi system bioluminisensi, sampai sekarang belum diketahui. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh sebuah model mekanisme senyawa beracun dalam mempengaruhi system bioluminisensi dari bakteri. Untuk mencapai tujuan penelitian tersebut dilakukan kajian teoritik berupa simulasi dan pemodelan menggunakan Software Chem3D versi 2.0 yang berfungsi untuk mendapatkan parameter geometris dari senyawa dan software DMKG/MOPAC yang berfungsi untuk mendapatkan energi potensial dan atom donor dan akseptor. Hasil yang diperoleh berupa model perubahan kurva energi potensial dan muatan setelah mengikat senyawa beracun dengan jenis kation yang berbeda-beda. Model ini digunakan sebagai dasar mengidentifikasi senyawa beracun menggunakan fenomena bioluminisensi dari bakteri. Hasil permodelan memperlihatkan bahwa yang mempengaruhi distribusi kerapatan elektron system bioluminisensi adalah kation dari senyawa beracun. Makin besar berat kation senyawa beracun maka akan menyebabkan makin besarnya penurunan intensitas bioluminisensi bakteri.

## PENGANTAR

Kegiatan penelitian dapat mendukung pengembangan ilmu pengetahuan serta terapannya. Dalam hal ini, Lembaga Penelitian Universitas Negeri Padang berusaha mendorong dosen untuk melakukan penelitian sebagai bagian integral dari kegiatan mengajarnya, baik yang secara langsung dibiayai oleh dana Universitas Negeri Padang maupun dana dari sumber lain yang relevan atau bekerja sama dengan instansi terkait.

Sehubungan dengan itu, Lembaga Penelitian Universitas Negeri Padang bekerjasama dengan Direktorat Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, Ditjen Dikti Kemendiknas RI dengan surat perjanjian kerja Nomor: 028/SP2H/PP/DP2M/III/2010 Tanggal 1 Maret 2010 telah membiayai pelaksanaan penelitian dengan judul *Kajian Sistem Identifikasi Senyawa Beracun Menggunakan Fenomena Bioluminisensi untuk Biosensor Lingkungan*.

Kami menyambut gembira usaha yang dilakukan peneliti untuk menjawab berbagai permasalahan pembangunan, khususnya yang berkaitan dengan permasalahan penelitian tersebut di atas. Dengan selesainya penelitian ini, Lembaga Penelitian Universitas Negeri Padang telah dapat memberikan informasi yang dapat dipakai sebagai bagian upaya penting dalam peningkatan mutu pendidikan pada umumnya. Di samping itu, hasil penelitian ini juga diharapkan memberikan masukan bagi instansi terkait dalam rangka penyusunan kebijakan pembangunan.

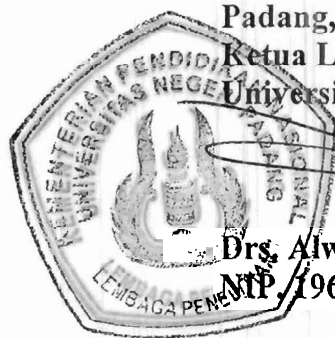
Hasil penelitian ini telah ditelaah oleh tim pembahas usul dan laporan penelitian, serta telah diseminarkan ditingkat nasional. Mudah-mudahan penelitian ini bermanfaat bagi pengembangan ilmu pada umumnya, dan peningkatan mutu staf akademik Universitas Negeri Padang.

Pada kesempatan ini, kami ingin mengucapkan terima kasih kepada berbagai pihak yang membantu pelaksanaan penelitian ini. Secara khusus, kami menyampaikan terima kasih kepada Direktur Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, Ditjen Dikti Kemendiknas yang telah memberikan dana untuk pelaksanaan penelitian tahun 2010. Kami yakin tanpa dedikasi dan kerjasama yang baik dari DP2M, penelitian ini tidak dapat diselesaikan sebagaimana yang diharapkan. Semoga hal yang demikian akan lebih baik lagi di masa yang akan datang.

Terima kasih.

Padang, November 2010

Ketua Lembaga Penelitian  
Universitas Negeri Padang,



Drs. Alwen Bentri, M.Pd.

NIP. 19610722 198602 1 002



## DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN .....	i
RINGKASAN DAN SUMMARY .....	ii
PRAKATA .....	iv
DAFTAR GAMBAR .....	v
DAFTAR LAMPIRAN .....	vi
I. PENDAHULUAN .....	1
II. TINJAUAN PUSTAKA .....	4
III. DESAIN DAN METODE PENELITIAN .....	11
IV. MANFAAT PENELITIAN.....	12
V. HASIL DAN PEMBAHASAN .....	13
VI. KESIMPULAN DAN SARAN .....	30
DAFTAR PUSTAKA .....	31
LAMPIRAN .....	33

## DAFTAR GAMBAR

	Hal	
Gambar 1	Bakteri luminisensi yang bersimbiosa pada cumi-cumi (a) bakteri menempati sepasang organ cahaya dari cumi, (b) posisi organ cahaya pada kantung tinta cumi-cumi, (c) bakteri dalam kantung organ cahaya cumi-cumi dan (d) struktur sel bakteri yang terdiri dari materi DNA dan polihidroksiburat (phb) (Pringgenis, 2003).	6
Gambar 2	Profil absorbansi dan aktivitas hasil pemurnian LBPP memakai kolom kromatografi gel filtrasi Sephadex G 100 dan (b) hasil elektroforesis dari protein standar dan beberapa nomor fraksi.	7
Gambar 3	Diagram energi reaksi bioluminisensi LBPP (Ratnawulan dkk, 2006(a)	8
Gambar 4	Spektrum pemancaran cahaya dari reaksi LBPP setelah diinjeksi dengan logam berat. Intensitas maksimum terjadi pada $\lambda = 516$ nm untuk setiap jenis logam berat.	9
Gambar 5	Korelasi koefisien inhibisi dengan energi bebas Gibbs dan berat atom logam berat	10
Gambar 6	Metode DMKG	12
Gambar 7	Skema energi yang berpola <i>up</i> , <i>down</i> dan <i>barrier</i> berdasarkan kriteria Sugimoto dkk. (1999). Tanda panah menunjukkan perubahan jarak antara dua molekul yang saling mendekati satu sama lain	15
Gambar 8	Jarak tegak lurus antara dua molekul R	16
Gambar 9	Model interaksi Asn dan FMNH <sub>2</sub> , (b) kurva perbedaan energi potensial dan (c) muatan total untuk reaksi penambahan proton sesuai pers. V.21 terhadap jarak molekul R. Tanda panah pada gambar menunjukkan arah pergerakan molekul Asn menuju sisi N <sub>1</sub> dari FMNH <sub>2</sub> .	18
Gambar 10	(a) Model interaksi O <sub>2</sub> dan FMNH <sup>-</sup> (b) Kurva perbedaan energi potensial dan (c) muatan total untuk reaksi penambahan molekul O <sub>2</sub> sesuai pers. V.22 terhadap jarak molekul R. Tanda panah pada gambar menunjukkan arah pergerakan atom O <sub>A</sub> menuju sisi C <sub>4a</sub> dari FMNH <sup>-</sup> .	19
Gambar 11	(a) Model interaksi Lys dan FMNHOO <sup>-</sup> , (b) Kurva perbedaan energi potensial dan (c) muatan total untuk reaksi pengikatan Lys sesuai pers. V.23 terhadap jarak molekul R Tanda panah pada gambar menunjukkan arah pergerakan molekul Lys-H <sup>+</sup> menuju atom O <sub>B</sub> pada FMNHOO <sup>-</sup> .	21
Gambar 12	(a) Model interaksi aldehid dan FMNHOOH, (b) kurva perbedaan	22

	energi potensial dan (c) muatan total untuk reaksi penambahan aldehyd sesuai pers. V.24 terhadap jarak molekul R. Tanda panah pada gambar menunjukkan arah pergerakan molekul Aldehyd menuju atom $O_B$ pada FMNHOOH	
Gambar 13	(a) Model interaksi RCOOH dan FMNHOO-CHOH-R, (b) Kurva perbedaan energi potensial dan (c) muatan total akibat pelepasan RCOOH dari FMNHOO-CHOH-R sesuai pers. V.25 sebagai fungsi jarak R. Tanda panah pada gambar menunjukkan arah pergerakan molekul RCOOH menjauhi sisi $O_A$ pada FMNHOO-CHOH-R .	23
Gambar 14	Model interaksi senyawa beracun Mangan Sulfate pada keadaan eksitasi sistem bioluminisensi bakteri	24
Gambar 15	Model interaksi senyawa beracun Cobalt sulfate pada keadaan eksitasi sistem bioluminisensi bakteri	25
Gambar 16	Model interaksi senyawa beracun Tembaga sulfate pada keadaan eksitasi sistem bioluminisensi bakteri	26
Gambar.17	Model interaksi senyawa beracun cadmium sulfate pada keadaan eksitasi sistem bioluminisensi bakteri	26
Gambar 18	Kurva perbedaan energi potensial pada reaksi LBPP	27
Gambar 19	Mekanisme model reaksi LBPP , (a) FMNH <sub>2</sub> ( $\Delta H_f = -82,28$ kkal/mol), (b) KT-1 ( $E_a = 3,9$ kkal/mol), (c) KI-1 ( $\Delta H_f = - 84,86$ kkal/mol), (d) KT-2 ( $E_a = 18,5$ kkal/mol), (e) KI-2 ( $\Delta H_f = -87,120$ kkal/mol), (f) KT-3 ( $E_a = 20$ kkal/mol), (g) KI-3 ( $\Delta H_f = -97,50$ kkal/mol), (h) KE atau IV* ( $E_a = 0$ kkal/mol, $\Delta H_f = - 97,5$ kkal/mol) dan (i) FMN ( $\Delta H_f = -17,28$ kkal/mol).	29

## DAFTAR LAMPIRAN

		<b>Hal</b>
Lampiran 1	Contoh perhitungan energi- reaksi bioluminisensi yang terkontaminasi logam berat mangan sulfat	35
Lampiran 2	Makalah publikasi 1	38
Lampiran 3	Makalah Publikasi 2	42
Lampiran 3	Makalah Publikasi 3	50

## I. PENDAHULUAN

Dunia perindustrian berkembang sangat cepat. Hasil negatif yang ditinggalkan adalah produk maupun limbah yang dapat mencemari lingkungan yang berbahaya bagi kehidupan manusia. Salah satu bentuk cemaran ialah limbah industri yang mengandung senyawa beracun seperti : arsenik, merkuri, phenol, cobalt dsb.

Untuk mendeteksi keberadaan senyawa beracun di lingkungan kita (air, udara dan makanan) biasanya memerlukan indikator organisme seperti tikus, kelinci maupun ikan. Tes ini biasanya kompleks, mahal dan memerlukan keahlian perorangan untuk melaksanakannya. Sebagai contoh, diperlukan analisa tambahan untuk menentukan apakah binatang tersebut mati akibat senyawa beracun atau akibat lainnya. Kemudian tes pada binatang memerlukan waktu sehari-hari untuk memantau kondisinya. Oleh sebab itu upaya untuk menemukan indikator baru yang bisa digunakan mendeteksi keberadaan senyawa di lingkungan dengan cara cepat, sederhana dan biaya rendah, perlu dilakukan. Salah satu alternatif untuk mengatasi masalah tersebut adalah menggunakan senyawa bioaktif dari organisme bakteri dimana responnya yang sangat cepat, populasi bakterinya yang besar dan biaya yang rendah (Kudryasheva, dkk, 1994).

Dari sejumlah besar bakteri yang terdapat di alam, bakteri yang memancarkan cahaya (bakteri luminesen) dapat dipilih sebagai indikator keberadaan senyawa beracun di lingkungan. Hal ini disebabkan produk cahaya yang dihasilkan bakteri merupakan proses fisika yang berkaitan erat dengan elektron yang berada dalam keadaan tereksitasi dan kembali ke keadaan dasarnya. Proses ini mudah diukur dan diamati berdasarkan perubahan intensitas cahaya yang dipancarkan.

Usaha untuk mendapatkan senyawa bioaktif dari bakteri luminesensi dimungkinkan karena bakteri tersebut banyak terdapat di perairan Indonesia. Dari hasil penelitian Pringgenies, dkk (2001) diketahui bahwa cumi-cumi jenis *Laligo duvaucelli* yang ada di perairan Indonesia dapat memancarkan cahaya (bioluminisensi) akibat adanya hubungan simbiosis antara cumi-cumi dengan bakteri *Photobacterium phosphoreum* yang hidup didalamnya. Tidak kalah penting adalah bakteri *Photobacterium Phosphoreum* merupakan jenis bakteri yang memancarkan cahaya paling terang dari semua bakteri luminesen dan cahaya yang dipancarkan ini berada pada daerah sinar tampak sehingga memungkinkan dapat terlihat dengan kasat mata (Madden and Lidesten, 2001).

Peneliti utama telah melaporkan penyebab dan mekanisme bioluminisensi dari bakteri *Photobacterium phosphoreum* ini (Ratnawulan, dkk, 2005 & 2006a). Hasil

penelitian berupa model mekanisme nanofabrikasi fotonik alamiah, akan menjadi dasar untuk aplikasi fenomena bioluminisensi sebagai biosensor monitoring lingkungan terhadap limbah atau produk industri yang berbahaya. Hasil penelitian pendahuluan menunjukkan adanya penurunan intensitas bioluminisensi bakteri ketika ditambahkan beberapa jenis senyawa toksin (Ratnawulan, dkk, 2006b). Penurunan intensitas bioluminisensi setelah mengikat senyawa toksin mengarahkan kesimpulan tentang kemampuan bakteri *Photobacterium phosphoreum* lokal sebagai bahan biosensor.

Selanjutnya Ratnawulan, dkk (2008) telah melakukan kajian eksperimental tentang perubahan perilaku intensitas cahaya dari bakteri akibat kehadiran logam berat. Meskipun dari hasil penelitian tersebut telah diperoleh perilaku penurunan intensitas bioluminisensi akibat kehadiran senyawa beracun, tetapi kenapa dan bagaimana mekanisme senyawa beracun mempengaruhi sistem bioluminisensi belum bisa dijelaskan secara utuh. Hal ini disebabkan karena proses transfer elektron atau proton antara molekul senyawa beracun dengan substrat dari LBPP untuk merubah keadaan eksitasi belum bisa dijelaskan. Wada, et al., (1999) mengungkapkan bahwa proses transfer elektron atau proton adalah kunci untuk mengungkapkan terbentuknya keadaan eksitasi pada reaksi bioluminisensi. Disamping itu, karena massa elektron atau proton yang terlibat dalam reaksi relatif kecil, efek kuantum seperti terobosan "tunneling" dan pemutusan ikatan, sangat sukar diobservasi didalam eksperimen dan model dinamika molekul klasik konvensional tidak dapat melukiskan efek ini secara benar. Untuk mengatasi masalah tersebut, maka diusulkan metode Dinamika Molekular Klasik Quantum (DMKQ) dari Ba, a et al , (1996) yang merupakan metode gabungan antara metode Dinamika Molekul (DM) Klasik dan Dinamika Quantum (DQ). Metode DMKQ ini sebelumnya telah sukses digunakan untuk menjelaskan transfer proton atau elektron pada reaksi enzim hidrolisis phospholipid (PLA). Dalam metode DMKQ, dinamika sebuah elektron atau proton pada sisi aktif LBPP dilukiskan dengan persamaan Schrodinger bergantung waktu (DQ), dan dinamika dari atom-atom yang lain yang melingkupi sisi aktif disimulasikan menggunakan dinamika kuantum klasik (DK). Penggunaan metoda DQ dan DK secara simultan diharapkan dapat menjelaskan dinamika kuantum dari elektron atau proton dari senyawa beracun mempengaruhi sistem bioluminisensi bakteri *Photobacterium phosphoreum*.

Dari hasil penelusuran pustaka, sampai saat ini belum ada literatur yang menerbitkan hasil-hasil penelitian yang mengkaji proses transfer elektron atau proton dari senyawa beracun ke sistem sistem bakteri luminesensi khususnya *Photobacterium phosphorium*. Oleh sebab itu kajian tentang mekanisme senyawa beracun mempengaruhi sistem bioluminisensi adalah penting dilakukan. Hal ini diperlukan sebagai landasan ilmiah dalam mendesain dan menginterpretasikan hasil biotest bioluminisensi sebagai alat monitoring lingkungan dari kehadiran senyawa beracun.

Ruang lingkup penelitian adalah mendapatkan sebuah model mekanisme senyawa beracun mempengaruhi sistem bioluminisensi dari bakteri *Photobacterium phosphoreum*. Penelitian dibatasi pada pemodelan transfer elektron atau proton dari senyawa beracun ke sistem bioluminisensi dari bakteri.

Asumsi utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah reaksi bioluminisensi pada bakteri *Photobacterium phosphoreum* merupakan reaksi reduksi-oksidasi yang menyebabkan sebuah substrat memberikan elektron pada substrat yang lain yang dikatalisis oleh LBPP. Perpindahan elektron dari sebuah senyawa beracun ke substrat menyebabkan terjadinya peningkatan energi pada substrat yang mendapat tambahan elektron tersebut untuk menghasilkan keadaan eksitasi yang tidak stabil sehingga meluruh kembali ke konfigurasi keadaan dasar sambil memancarkan cahaya tampak. Transfer proton atau elektron tersebut akan menyebabkan perubahan bentuk kurva permukaan dari energi potensial sehingga dapat dihitung dan disimulasikan dengan metoda DMKQ.

Penelitian ini merupakan terobosan baru dalam bidang fisika bioluminisensi di Indonesia sehingga penelitian ini dapat menjadi jembatan bagi kerjasama antar peneliti dalam berbagai bidang ilmu seperti biofisika, biokimia, bakteriologi dan kelautan.

Penelitian ini penting dilakukan, mengingat sudah banyak informasi ilmiah yang tersedia dari fenomena bioluminisensi bakteri luminesensi lokal ini, seperti: penyebab, karakteristik dan mekanisme bioluminisensi bakteri (Ratnawulan, dkk, 2005, 2006a, 2006b). Masalahnya sekarang adalah bagaimana memanfaatkan fenomena bioluminisensi ini untuk kepentingan berbagai aplikasi, khususnya sebagai biosensor lingkungan untuk memonitor senyawa beracun di alam.

#### a. Perumusan masalah

Dalam penelitian ini masalah yang akan diselesaikan adalah bagaimana mendapatkan model mekanisme senyawa beracun mempengaruhi sistem bioluminisensi khususnya transfer elektron atau proton pada pembentukan keadaan eksitasi akibat kehadiran senyawa beracun pada sistem bioluminisensi pada bakteri *Photobacterium phosphoreum*.

#### b. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah diperoleh sebuah model mekanisme senyawa beracun mempengaruhi sistem bioluminisensi dari bakteri *Photobacterium phosphoreum*

yang diisolasi dari cumi-cumi laut Indonesia khususnya model transfer elektron atau proton dari senyawa beracun ke substrat untuk mempengaruhi keadaan eksitasi.

### c. Hipotesis

Pada penelitian ini hipotesis yang akan diuji adalah hipotesis yang diusulkan oleh Ratnawulan, dkk (2008) bahwa jumlah kation senyawa beracun berpengaruh pada terhadap distribusi kerapatan elektron sistem bioluminisensi. Makin besar berat kation senyawa beracun menyebabkan  $\Delta G$  makin kecil yang mengakibatkan makin besarnya inhibisi/penurunan intensitas bioluminisensi bakteri.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

Fenomena bioluminisensi pada organisme hidup telah menjadi objek perhatian semenjak zaman dahulu kala. Ketika Cristopher Columbus menyeberangi laut Atlantik, ia sering melihat cahaya luminesensi misterius di sekitar kapalnya. Saat itu, dijelaskan bahwa luminesensi yang ditemukan di laut dihubungkan dengan monster atau misteri lain yang belum diketahui (Harvey, 1920 dikutip dari Floyd, 1997).

Usaha serius pertama ilmuwan untuk menyelidiki asal muasal luminesensi pada organisme dimulai pada pertengahan tahun 1600 Masehi. Saat itu Boyle menguji pengaruh oksigen pada luminesensi yang teramati pada daging yang sudah mati. (Harvey, 1952 dikutip dari Kruse dan Boyle, 2000). Pada tahun 1830, ilmuwan Jerman, G.A. Michaelis, menemukan bahwa luminesensi dari daging yang sudah mati disebabkan oleh sesuatu yang hidup (Harvey, 1920 dikutip dari Biron, 2003). Penemuan G.A. Michaelis ini merupakan titik awal para peneliti untuk mengobservasi luminesensi pada makhluk hidup. Saat ini, bioluminisensi telah diobservasi pada ribuan spesies meliputi kunang-kunang, jamur, binatang laut dan bakteri.

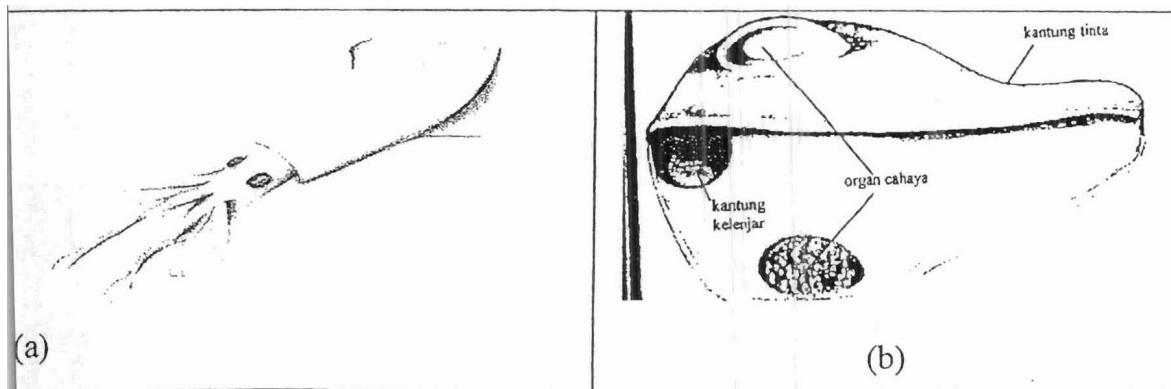
Salah satu spesies yang menarik perhatian adalah bakteri luminesensi. Bakteri luminesensi mayoritas ditemukan di alam dalam bentuk simbiosis dengan makhluk hidup yang lain seperti ikan, cumi dan ada juga yang mampu hidup bebas di alam (Meyer-schow, 2001). Holt dkk. (1994) mengungkapkan bahwa bakteri luminesensi dapat dikelompokkan atas tiga genus: pertama *Photobacterium*, kedua *Vibrio*, dan ketiga *Symbiobacterium*. Genus yang ada pada lingkungan laut dikelompokkan sebagai

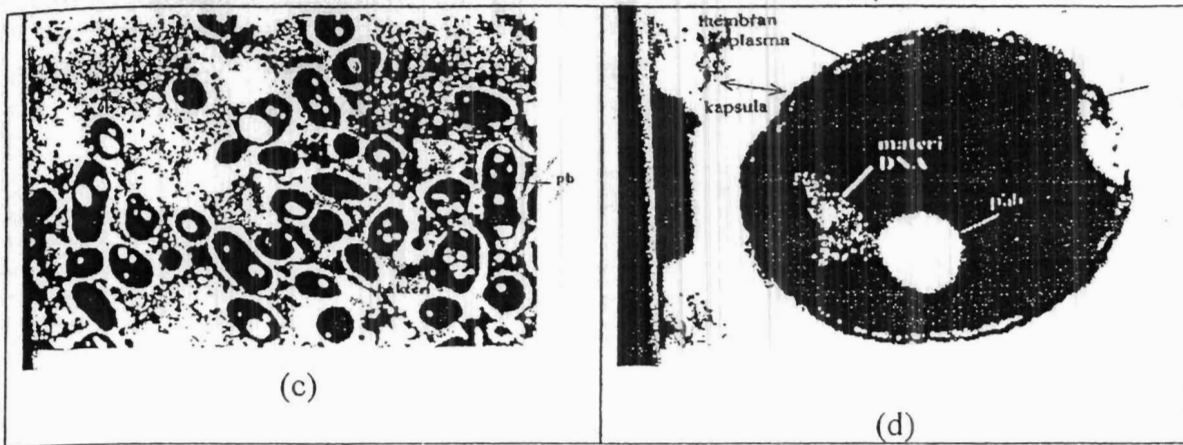


*Photobacterium* dan *Vibrio*. Genus *Photobacterium* kebanyakan bersimbiosa pada organ cahaya dari binatang laut sedangkan genus *Vibrio* selain ada dalam keadaan bersimbiosa juga ditemukan dalam keadaan hidup bebas di dalam laut. Sedangkan genus *Photorhabdus* hidup bebas di lingkungan darat.

a. Isolasi Bakteri Luminisensi *Photobacterium phosphoreum* dari Cumi *Loligo duvaucelli* Laut Indonesia

Pringgenis, dkk, (2001) menemukan kehadiran bakteri *Photobacterium phosphoreum* pada cumi-cumi jenis *Loligo duvauceli* di laut Indonesia. Populasi cumi-cumi ini dominan di laut Indonesia dan termasuk dalam cumi-cumi ekonomis penting. Bakteri *Photobacterium phosphoreum* terdapat pada sepasang organ cahaya yang menempel pada bagian dorso-lateral kantung tinta seperti diperlihatkan pada Gambar 1(a). Posisi organ cahaya di bagian dorsal kantung tinta cumi mudah diketahui karena berwarna kontras yaitu putih dengan panjang 2 s.d 5 mm seperti diperlihatkan pada Gambar 1(b). Didalam organ cahaya terdapat kantung organ cahaya yang berisi penuh dengan koloni bakteri seperti diperlihatkan pada Gambar 1(c). Sel bakteri tampak berbentuk batang atau silinder dan tidak mempunyai rambut getar atau flagella. Ukuran bakteri adalah  $0,9 \mu\text{m} \times 3,2 \mu\text{m}$ . Permukaan sel bakteri mengandung suatu lapisan kapsula dan didalam sel terdapat satu atau lebih butiran phb (polihidroksiburat) serta DNA seperti yang diperlihatkan pada Gambar 1(d). Keberadaan kapsula pada bakteri *Photobacterium phosphoreum* ini merupakan karakteristik khas yang dimiliki oleh strain tropis yang berbeda dari jenis *Photobacterium phosphoreum* yang pernah dilaporkan.



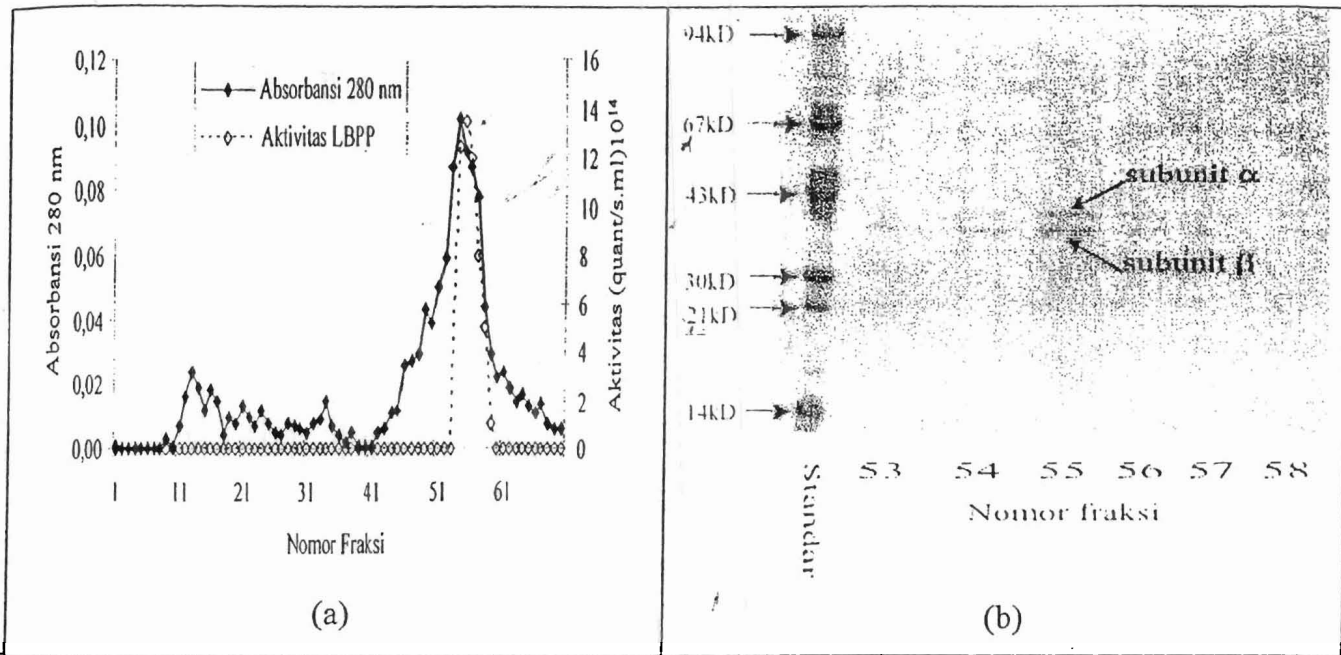


Gambar 1 Bakteri luminisensi yang bersimbiosa pada cumi-cumi (a) bakteri menempati sepasang organ cahaya dari cumi, (b) posisi organ cahaya pada kantung tinta cumi-cumi, (c) bakteri dalam kantung organ cahaya cumi-cumi dan (d) struktur sel bakteri yang terdiri dari materi DNA dan polihidroksiburat (phb) (Pringgenis, dkk, 2001).

Bakteri *Photobacterium phosphoreum* mudah ditumbuhkan dalam laboratorium dengan cara mengeluarkan kantong tinta dari cumi kemudian organ cahaya dilepas dari kantong tinta dan dipisahkan dari lensanya. Lensa kemudian dibelah dan digerus supaya bakteri dapat dibiakkan pada media “agar miring”.

#### b. Identifikasi dan Pemurnian Senyawa Aktif Penyebab Pemancaran cahaya pada Bakteri *Photobacterium phosphoreum*

Senyawa aktif penyebab pemancaran cahaya pada bakteri *Photobacterium phosphoreum* yang diisolasi dari cumi laut Indonesia telah berhasil diisolasi dan dimurnikan sampai 97% oleh Ratnawulan, dkk, (2005) dengan metode DEAE Selulosa dan kromatografi gel filtrasi Sephadex G 100. Senyawa aktif tersebut dinamakan dengan luciferase disingkat LBPP (Luciferase Bakteri *Photobacterium phosphoreum*). LBPP terdiri dari dua subunit  $\alpha$  dan subunit  $\beta$  dengan berat molekul masing-masing adalah 41 kD dan 38 kD (Gambar 2b). Aktivitas spesifik dari LBPP adalah  $3,5 \times 10^{16}$  quanta /s.mg (Gambar 2a).



Gambar 2 (a) Profil absorbansi dan aktivitas hasil pemurnian LBPP memakai kolom kromatografi gel filtrasi Sephadex G 100 dan (b) hasil elektroforesis dari protein standar dan beberapa nomor fraksi.

Tujuan pemurnian adalah untuk mendapatkan LBPP pada kemurnian tertentu sehingga dapat digunakan sebagai medium dalam mengikat senyawa-senyawa toksin organik dan anorganik di alam.

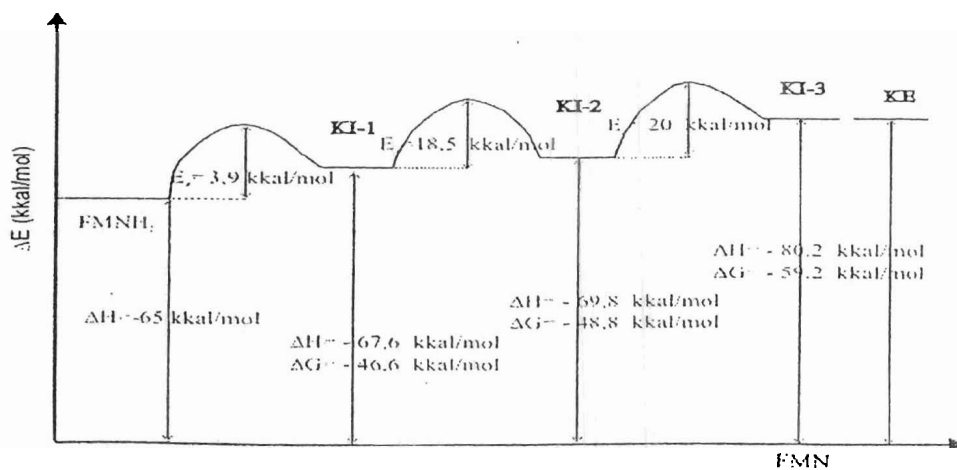
### c. Karakterisasi Sifat Fisis Pemancaran Cahaya Reaksi Bioluminisensi Bakteri *Photobacterium phosphoreum*

Hasil analisis karakteristik fisis pemancaran cahaya dari reaksi bioluminisensi bakteri *Photobacterium phosphoreum*, menunjukkan bahwa panjang gelombang eksitasi dari intermediat II dan intermediat III adalah 366 nm dan 350 nm sedangkan panjang gelombang cahaya emisi adalah 516 nm. Reaksi berlangsung pada kondisi optimum dimana pH adalah 7, temperatur adalah 25°C, konstanta peluruhan cahaya adalah 0,007/s, *quantum yield* adalah 0,3 dan energi aktivasi reaksi adalah 19 kkal/mol. Perubahan pH, temperatur, konsentrasi oksigen dan kontaminasi toksin organik dan anorganik tidak menyebabkan pergeseran panjang gelombang emisi 516 nm tetapi hanya mengubah intensitas cahaya (Ratnawulan, dkk, 2004).

Dengan diketahuinya karakteristik fisis pemancaran cahaya dari reaksi bioluminisensi bakteri *Photobacterium phosphoreum*, maka setiap pengukuran kadar toksin organik dan anorganik dilakukan pada kondisi optimum ini.

**d. Karakterisasi Sifat Fisis Pembentukan Keadaan Eksitasi Reaksi Bioluminisensi Bakteri *Photobacterium phosphoreum***

Hasil prediksi kedudukan aktif menggunakan metoda MNDO-PM3 mendapatkan bahwa dan asparagin (Asn) dan lysin (Lys-H<sup>+</sup>) pada LBPP adalah representasi residu-residu katalis yang terlibat dalam proses protonasi dan deprotonasi dari substrat FMNH<sub>2</sub> (Arif & Ratnawulan, 2006). Mekanisme pembentukan keadaan eksitasi pada bakteri *Photobacterium phosphoreum* diperoleh dari hasil analisis pengikatan kedudukan aktif LBPP dengan substrat-substratnya (Arif & Ratnawulan, 2006). Karakteristik energi aktivasi dan urutan reaksi LBPP memperlihatkan bahwa deprotonasi pada kedudukan N<sub>1</sub> dari FMNH<sub>2</sub> oleh residu asam amino Asn untuk membentuk intermediat I mengalami energi aktivasi sebesar 3,9 kkal/mol. Reaksi intermediat I dengan O<sub>2</sub> membentuk intermediat II dengan energi aktivasi sebesar 18,5 kkal/mol. Reaksi intermediat II dengan RCOH membentuk intermediat III dengan energi aktivasi sebesar 20 kkal/mol. Pelepasan molekul RCOOH dari intermediat III membentuk intermediat IV\* yang disebut dengan keadaan eksitasi. Hasil analisis pengukuran panjang gelombang cahaya secara eksperimen memberikan perubahan energi bebas Gibbs sebesar -55,228 kkal/mol. Sedangkan hasil analisis karakteristik fisis pembentukan keadaan eksitasi memberikan perubahan energi bebas Gibbs sebesar -59,22 kkal/mol (Gambar 3). Oleh karena kedua hasil analisis bersesuaian maka mekanisme yang diusulkan untuk pembentukan keadaan eksitasi sudah memenuhi syarat energi bagi terjadinya reaksi bioluminisensi pada bakteri *Photobacterium phosphoreum*.

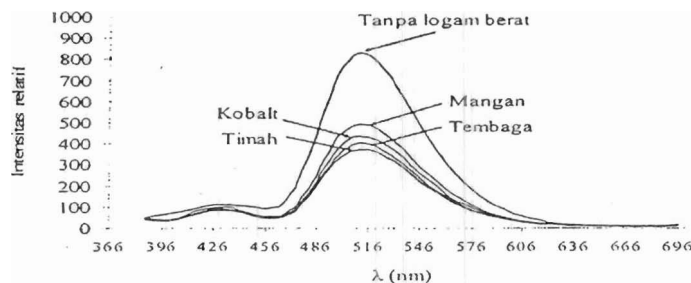


Gambar 3. Diagram energi reaksi bioluminisensi LBPP (Ratnawulan, dkk, 2006a).

Model mekanisme bioluminisensi ini selanjutnya digunakan sebagai model awal mekanisme bioluminisensi bakteri sebelum diberisenyawa beracun. Model awal ini merupakan landasan dalam mempelajari perilaku perubahan intensitas bioluminisensi setelah diberi senyawa senyawa beracun

#### 4.2.5. Pengaruh Logam Berat Terhadap Intensitas Cahaya dari LBPP

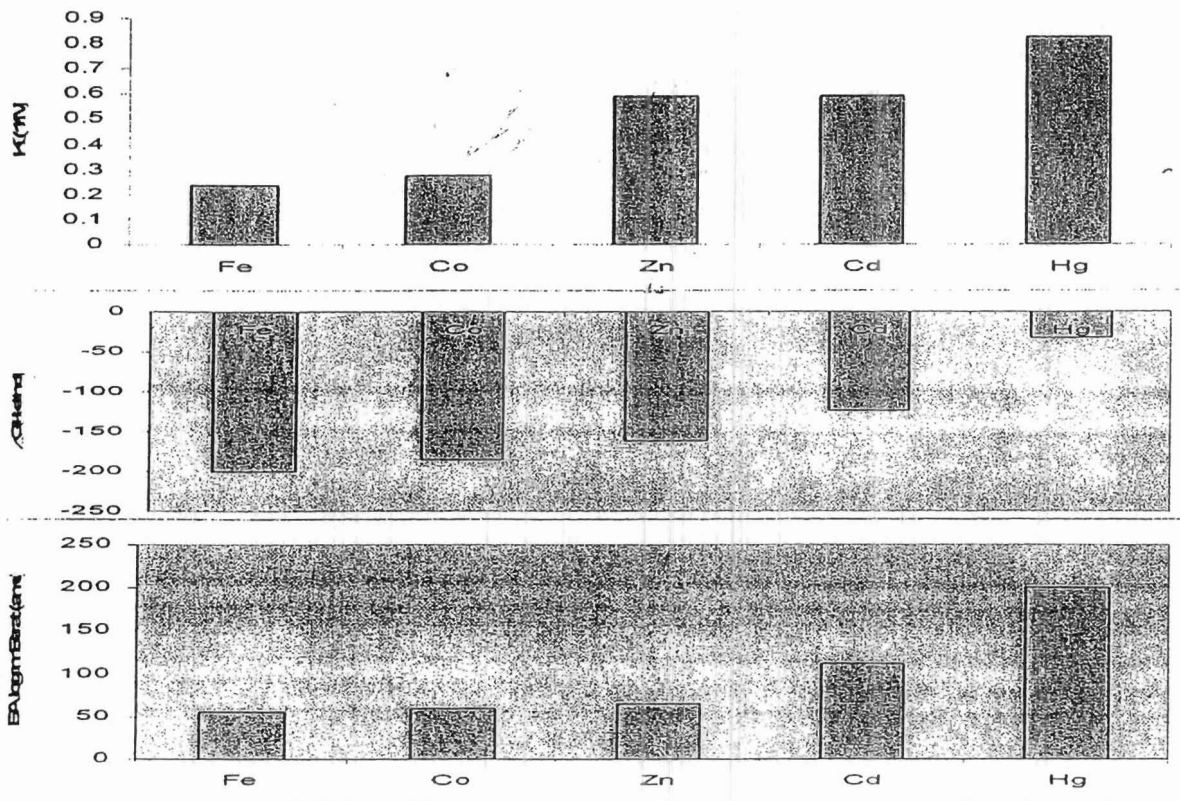
Penelitian ini dilatar belakangi oleh adanya perubahan intensitas bioluminisensi bakteri *Photobacterium phosphoreum* ketika ditambahkan beberapa jenis logam berat, seperti yang telah dilaporkan oleh Papilaya, dkk., (2004) dan Ratnawulan, dkk, (2006b). Hasil pengukuran spektrum pemancaran cahaya dari LBPP setelah diinjeksi dengan logam berat dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar4. Spektrum pemancaran cahaya dari reaksi LBPP setelah diinjeksi dengan logam berat. Intensitas maksimum terjadi pada  $\lambda = 516$  nm untuk setiap jenis logam berat.

Gambar 4 memperlihatkan bahwa kehadiran toksin logam berat tidak mempengaruhi panjang gelombang pada intensitas pemancaran maksimum. Intensitas pemancaran maksimum terjadi pada panjang gelombang 516 nm. Kehadiran timah menyebabkan intensitas cahaya turun lebih besar dibandingkan dengan tembaga, kobalt dan mangan untuk konsentrasi 3 mg/l. Walaupun hasil ini mengarahkan kesimpulan tentang sensitifitas reaksi LBPP terhadap senyawa beracun.

Dari hasil kajian eksperimen yang dilakukan oleh Ratnawulan, dkk (2008) menunjukkan karakteristik Inhibisi dan Aktivasi dari senyawa beracun pada sistem bioluminisensi bakteri *Photobacterium phosphoreum* diperlihatkan pada Gambar 5 berikut.



Gambar 5. Korelasi koefisien inhibisi dengan energi bebas Gibbs dan berat atom logam Berat

Pola pada Gambar 5 dapat digunakan untuk menjelaskan pengaruh kation pada proses transfer elektron dan sistem bioluminisensi. Kation dapat berpartisipasi dalam distribusi kembali kerapatan elektron dalam reaksi kimia dan dalam pembentukan keadaan eksitasi elektron. Pola ini menjelaskan bahwa aktivasi bioluminesensi diobservasi dalam kehadiran logam berat dengan nilai  $\Delta G^0$  (e) yang lebih tinggi, yang memperlihatkan kemungkinan paling rendah dari penggantian elektron dengan kation. Inhibisi bioluminisensi diobservasi dalam kehadiran logam berat  $\Delta G^0$  (e) yang lebih rendah.

Untuk menjelaskan kenapa dan mengapa senyawa beracun tersebut dapat mempengaruhi sistem bioluminisensi, maka diperlukan kajian teoritik yang melibatkan transfer elektron atau proton dari senyawa beracun ke sistem bioluminisensi tersebut.

#### d. Studi Lanjutan yang Akan Dilaksanakan

Berdasarkan hasil-hasil yang telah dicapai, maka penelitian lanjutan yang akan dilaksanakan adalah mengkaji secara teoritik hasil eksperimental dari Ratnawulan, dkk (2008) sehingga diperoleh sebuah model tentang mekanisme senyawa beracun mempengaruhi sistem bioluminisensi dari bakteri. Model ini digunakan untuk merancang

sebuah metode monitoring polutan berbahaya di alam menggunakan senyawa aktif bakteri *Photobacterium phosphoreum*.

### III. DESAIN DAN METODE PENELITIAN

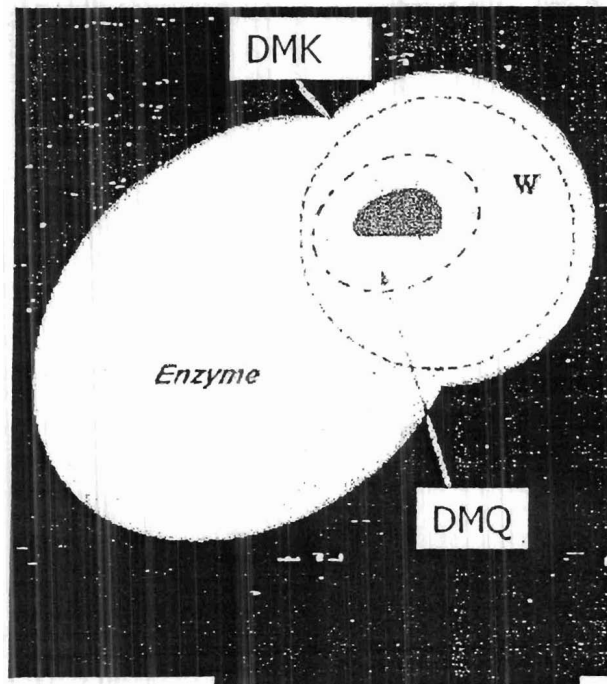
Desain yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimen semu. Eksperimen semu digunakan untuk menguji hipotesis yaitu “makin besar berat kation senyawa beracun menyebabkan  $\Delta G$  makin kecil yang mengakibatkan makin besarnya inhibisi intensitas bioluminisensi bakteri”.

Eksperimen semu diimplementasikan menggunakan simulasi komputer. Keunggulan dari rancangan eksperimen semu ini adalah data-data penelitian dapat dibuat secara sintetik sehingga akan mengeliminasi masalah biaya dan waktu. Kekurangan metode ini adalah adanya sifat ambiguitas yaitu jenis residu yang berbeda dapat menghasilkan respon energi potensial yang sama. Hal ini akan diatasi dengan melakukan pengujian secara berulang-ulang dan melakukan verifikasi terhadap metoda sejenis.

Masalah akan diselesaikan dengan melakukan pemodelan mekanisme bioluminisensi dari bakteri *Photobacterium phosphoreum* khususnya pemodelan proses transfer elektron atau proton dari senyawa beracun ke substrat yang membentuk keadaan eksitasi. Data input yang akan digunakan adalah parameter-parameter geometri dari LBPP sebelum dan setelah mengikat senyawa beracun. Senyawa beracun yang dipakai adalah disesuaikan dengan senyawa beracun yang digunakan dalam kajian eksperimental Ratnawulan, dkk (2008) yaitu : senyawa mercury, besi, cobalt, seng dan cadmium. Kemudian dengan bantuan metoda DMKQ akan dianalisis hubungan antara perubahan bentuk kurva permukaan energi potensial terhadap jarak antar atom pada sisi aktif LBPP dan perubahan jarak antar atom terhadap perubahan muatan. Proses transfer elektron atau proton ditandai dengan perubahan bentuk kurva permukaan energi potensial 3D.

Struktur LBPP sebelum dan sesudah mengikat senyawa beracun dibagi kedalam dua daerah yaitu daerah yang dikenal dengan daerah klasik dan mengandung atom-atom diluar sisi aktif dan daerah yang dikenal sebagai daerah kuantum adalah ekuivalen dengan sisi aktif dan terdiri dari fragmen-fragmen molekul yang secara langsung terlibat dalam reaksi LBPP. Dalam model ini, dinamika sebuah proton didalam sisi aktif dari LBPP dilukiskan dengan persamaan Schrodinger bergantung waktu, dan dinamika dari atom-atom yang lain diluar sisi aktif disimulasikan menggunakan dinamika kuantum klasik (Gambar 6).

- Potensial DMQ untuk daerah pusat aktif
- Potensial DMQ untuk lingkungannya
- Batas- batas



Gambar 6. Metode DMKQ

#### IV. MANFAAT PENELITIAN

Hasil penelitian ini akan memberikan kontribusi terhadap khazanah ilmu pengetahuan dasar berupa landasan ilmiah orisinalitas tinggi dalam menginterpretasikan hasil biotest bioluminisensi sebagai alat monitoring senyawa beracun di alam. Kajian teori ini penting untuk menjadi landasan dalam mendesain dan menginterpretasikan hasil biotest bioluminisensi sebagai alat monitoring senyawa beracun di alam. Selain itu penelitian ini merupakan terobosan baru dalam studi bioluminisensi bakteri *Photobacterium Phosphoreum* khususnya sifat-sifat dasar fisika bioluminisensi.

Bila perilaku dasar fisika dari bakteri *Photobacterium phosphoreum* setelah diberi senyawa beracun dapat diketahui maka hasil penelitian ini diharapkan akan melahirkan sebuah metode baru untuk monitoring senyawa beracun di alam sehingga hasil penelitian ini kelak akan mempunyai nilai komersial tinggi dan berpotensi untuk memiliki hak atas kekayaan intelektual berupa paten.

Luaran dari penelitian berupa sebuah model sistem bioluminisensi sebelum dan sesudah mengikat senyawa beracun. Hasil temuan ini akan dipresentasikan dalam Seminar Nasional *Annual Physics 2009* di Bandung. Sedangkan makalah lengkap berisikan analisis tentang perubahan perilaku parameter fisika bioluminisensi bakteri *Photobacterium phosphoreum* setelah diberi senyawa beracun akan diusulkan untuk dipublikasikan



## V. HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dikonsentrasikan untuk menemukan landasan ilmiah pengaruh kation senyawa beracun (logam berat) pada distribusi rapat elektron dalam sistem bioluminisensi bakteri *Photobacterium phosphoreum*.

Dua langkah utama yang telah dilakukan dalam penelitian tahun I ini terdiri dari (1) melakukan kajian teoritik mekanisme senyawa beracun mempengaruhi keadaan eksitasi reaksi bioluminisensi bakteri *Photobacterium phosphoreum*, (2) melakukan simulasi untuk mendapatkan model senyawa beracun mempengaruhi reaksi bioluminisensi, (3) analisis landasan ilmiah pengaruh kation logam berat pada distribusi rapat elektron dalam sistem bioluminisensi bakteri *Photobacterium phosphoreum*.

### 1 (a). Landasan Teoritik Mekanisme Senyawa Beracun Mempengaruhi Keadaan Eksitasi Reaksi Bioluminisensi Bakteri *Photobacterium phosphoreum*

Dari sudut pandang energi, reaksi bioluminisensi terjadi ketika sebagian besar energi kimia yang eksoterm  $\Delta H$  diubah menjadi energi eksitasi elektronik  $\Delta H^*$  yang meluruh ke keadaan dasar sambil memancarkan cahaya tampak ( $h\nu$ ). Secara ringkas prosesnya dapat dirumuskan sebagai berikut



Langkah  $\Delta H \rightarrow \Delta H^*$  disebut langkah pembentukan keadaan eksitasi (kemieksitasi) dan langkah  $\Delta H^* \rightarrow h\nu$  disebut langkah proses pemancaran cahaya (kemiluminisensi). Persyaratan energi ditentukan berdasarkan kriteria dari Gracia-Compana dkk. (2001) sebagai berikut

$$-\Delta G \geq hc/\lambda \quad (2)$$

dimana  $\Delta G$  adalah perubahan energi bebas Gibbs,  $h$  adalah konstanta Planck ( $6,626 \times 10^{-34}$  J.s),  $c$  adalah kecepatan penjalaran cahaya dalam ruang vakum ( $3 \times 10^8$  m.s<sup>-1</sup>) dan  $\lambda$  adalah panjang gelombang cahaya yang dipancarkan.

Hubungan antara perubahan energi bebas Gibbs  $\Delta G$  dengan perubahan enthalpi  $\Delta H$  dapat ditulis

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (3)$$

Perubahan entropi  $\Delta S$  dapat dinyatakan dalam persamaan empiris (Lehrer dan Barker, 1970 dikutip dari Tu, 1979) sebagai berikut

$$\Delta S = 4,6 (\log k - 10,74 \log T) \quad (4)$$

dimana  $k$  adalah konstanta peluruhan dan  $T$  adalah temperatur reaksi pada skala Kelvin. Hubungan perubahan enthalpi pada keadaan eksitasi  $\Delta H^*$  dengan energi aktivasi  $E_a$  dapat ditulis sebagai berikut

$$\Delta H^* = E_a + RT \quad (5)$$

Sedangkan hubungan perubahan energi bebas Gibbs pada keadaan eksitasi  $\Delta G^*$  dengan perubahan enthalpi pada keadaan eksitasi  $\Delta H^*$  dapat dinyatakan sebagai berikut

$$\Delta G^* = \Delta H^* - T\Delta S^* \quad (6)$$

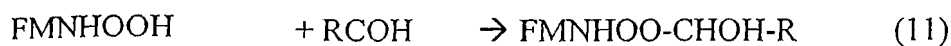
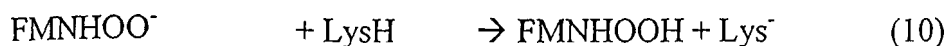
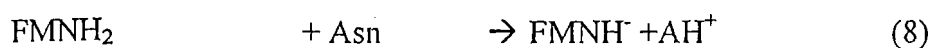
Sedangkan perubahan entropi pada keadaan eksitasi  $\Delta S^*$  dapat dinyatakan dalam persamaan empiris (Lehrer dan Barker, 1970 dikutip dari Tu, 1979) sebagai berikut

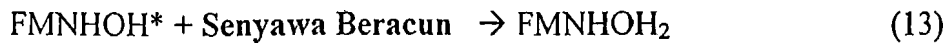
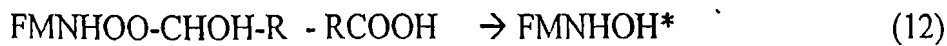
$$\Delta S^* = 4,6 \{ \log k - 10,7 - \log T + E_a / (4,6 T) \} \quad (7)$$

Karena reaksi bioluminisensi dapat dirumuskan ke dalam dua langkah energi yaitu langkah kemieksitasi dan langkah kemiluminisensi, maka mekanisme senyawa beracun mempengaruhi reaksi bioluminisensi bakteri dapat dijelaskan dengan menggabungkan seluruh informasi yang terkandung pada kedua langkah tersebut..

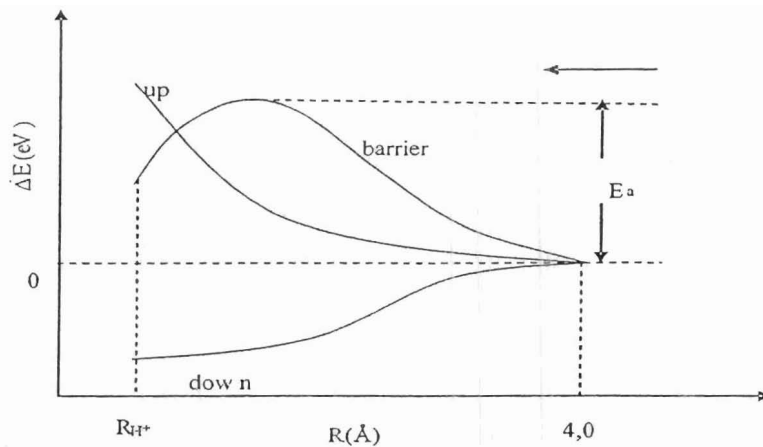
#### (b) Model Reaksi Pembentukan Keadaan Eksitasi pada Reaksi Bioluminisensi (LBPP) akibat kehadiran senyawa beracun

Model reaksi pembentukan keadaan eksitasi pada LBPP berdasarkan pers. Reaksi bioluminisensi dari bakteri dapat ditulis sebagai berikut :





Senyawa beracun yang dimaksud dalam penelitian ini adalah Cadmium sulfat ( $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ), Tembaga sulfat ( $\text{C}_4(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{OSO}_4$ ), Kobalt sulfat ( $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) dan Mangan sulfat, ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ). Mekanisme senyawa beracun mempengaruhi sistem beracun dapat diprediksi menggunakan metode MNDO-PM3 dengan menghitung perbedaan energi potensial akibat perpindahan proton untuk beberapa residu asam amino yang bersifat asam dan basa berdasarkan pers. 8 s.d 13. Perpindahan proton pada LBPP akan diprediksi berdasarkan kriteria perbedaan energi potensial dari Sugimoto dkk. (1999). Tiga skenario dari Sugimoto dinyatakan pada skema dalam Gambar 7



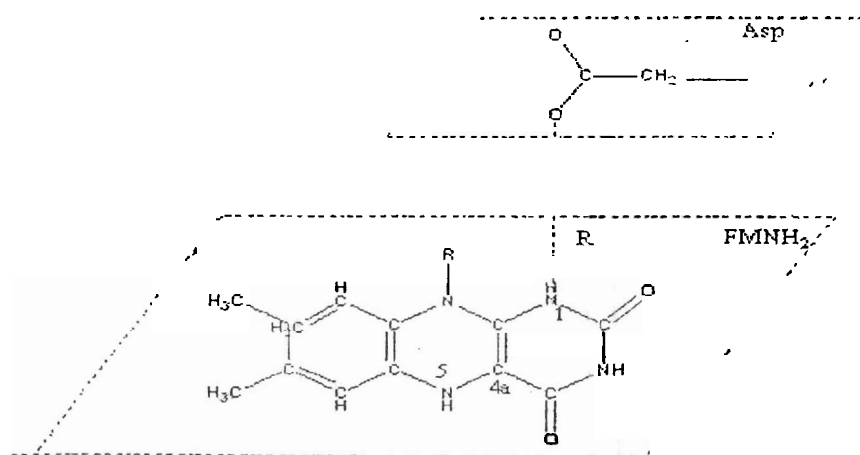
Gambar 7 Skema energi yang berpola *up*, *down* dan *barrier* berdasarkan kriteria Sugimoto dkk. (1999). Tanda panah menunjukkan perubahan jarak antara dua molekul yang saling mendekati satu sama lain

Kurva energi yang berpola *up* menunjukkan bahwa reaksi sukar terjadi, kurva energi yang berpola *barrier* dengan energi barrier aktivasi (energi aktivasi)  $E_a$  menunjukkan bahwa reaksi dapat terjadi sedangkan kurva energi yang berpola *down* menunjukkan bahwa reaksi spontan terjadi. Berdasarkan fungsi LBPP yang merendahkan energi *barrier* aktivasi  $E_a$  supaya reaksi bioluminisensi dapat terjadi maka skenario energi yang dipilih berdasarkan Gambar 7 adalah skenario adanya energi barrier aktivasi ( $E_a$ ) atau berpola *down*. Tetapi bila terjadi energi barrier aktivasi pada semua reaksi maka skenario yang dipilih adalah reaksi dengan energi barrier minimum. Hal ini didasarkan atas asumsi

bahwa energi barrier minimum akan mempercepat laju reaksi sesuai persamaan Arrhenius dimana nilai  $E_a$  adalah besar bila laju reaksi adalah kecil sehingga kriteria  $E_a$  minimum terpenuhi.

Verifikasi energi aktivasi akibat kehadiran logam berat dilakukan dengan cara mencocokkan energi aktivasi yang diperoleh dari perhitungan dengan yang diperoleh dari eksperimen. Untuk menghitung perbedaan energi potensial akibat perpindahan proton pada setiap pers. 8 s.d 13 diperlukan data masukan geometri internal dari molekul-molekul yang bersangkutan. Susunan molekul menunjukkan posisi relatif antara dua atom yang berdekatan sehingga membentuk ikatan kimiawi molekul. Untuk menspesifikasi ikatan ini, diperlukan tiga besaran yaitu jarak antar atom yang berikatan, sudut antara dua ikatan dalam bidang dan sudut antara bidang ikatan yang berdekatan (*dihedral angle*). Selain itu diperlukan juga label atom-atom terdekat.

Struktur geometri dan keadaan elektronik setiap molekul dioptimasi terhadap energi total menggunakan metoda MNDO-PM3. Kurva energi potensial setiap reaksi diperoleh setelah melakukan minimisasi energi total terhadap semua parameter geometri kecuali jarak tegak lurus antara molekul R. Contoh jarak tegak lurus antara dua molekul dapat dilihat pada Gambar 8



Gambar 8 Jarak tegak lurus antara dua molekul R

Kurva energi potensial diperoleh berdasarkan perbedaan energi total  $\Delta E$  yang didefinisikan sebagai berikut

571 / hnd/2014 - G. r. (c)  $\Delta E = E(R) - E_0$

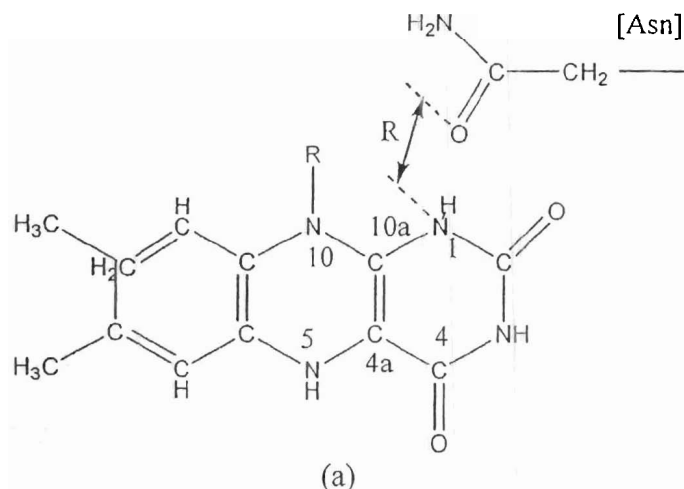
(14)

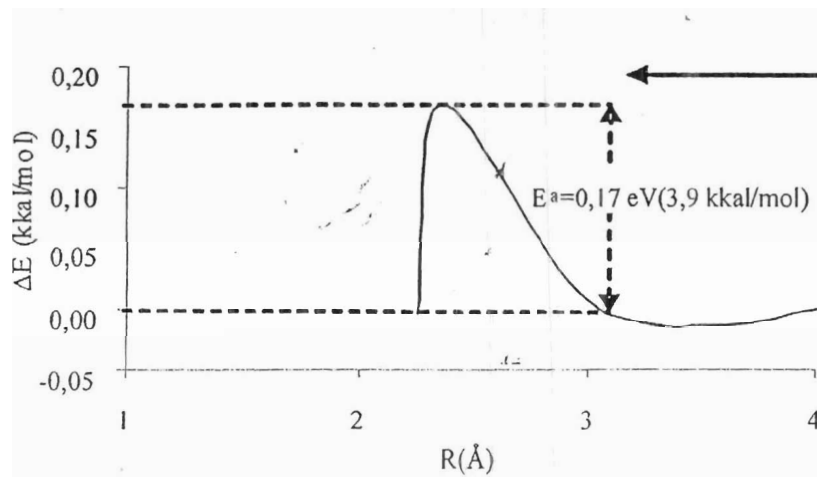
dimana  $E(R)$  adalah energi total sistem pada jarak  $R$  dan  $E_0$  adalah energi total sistem pada jarak acuan  $R_0 = 4\text{\AA}$ . Dalam penelitian ini digunakan dua sisi pengikatan pada FMNH<sub>2</sub> yaitu sisi N<sub>1</sub> dan sisi C<sub>4a</sub>. Sisi N<sub>1</sub> digunakan sebagai tempat pengikatan residu asam amino yang bersifat asam dan sisi C<sub>4a</sub> digunakan sebagai tempat pengikatan residu asam amino yang bersifat basa. Pemilihan sisi N<sub>1</sub> dan C<sub>4a</sub> dari FMNH<sub>2</sub> sebagai sisi pengikatan adalah sesuai dengan hasil penemuan Vervoort dkk. (1986a dan 1986b), Wada dkk. (1997 dan 1999) dan Sugimoto dkk. (1999), bahwa sisi N<sub>1</sub> adalah tempat deprotonisasi dan sisi C<sub>4a</sub> adalah tempat protonisasi. Dalam penelitian ini dipilih molekul lumiflavin ( $R = -CH_3$ ) sebagai substrat FMNH<sub>2</sub>.

## 2. Mekanisme Pembentukan Keadaan Eksitasi dengan kehadiran senyawa beracun pada Reaksi LBPP

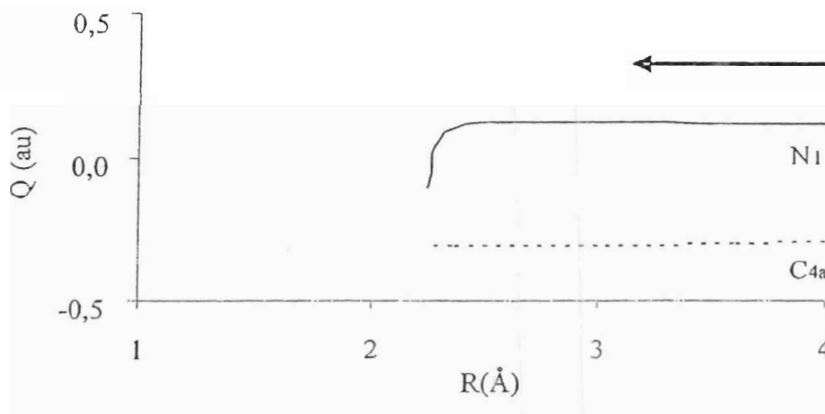
Untuk mendapatkan pembentukan keadaan eksitasi (kemieksitasi) dengan kehadiran senyawa beracun, setiap persamaan 8 sampai 13 dihitung perubahan energi potensial dan perpindahan muatan antar molekul. Setiap persamaan dihitung perubahan energi potensial terhadap jarak antar molekul akibat proses reaksi. Dengan asumsi bahwa reaksi bioluminisensi pada bakteri *Photobacterium phosphoreum* adalah reaksi redoks yang melibatkan perpindahan elektron atau proton, maka dapat juga ditinjau perubahan muatan pada sisi pengikatan substrat.

Kurva perbedaan energi potensial  $\Delta E$  dan muatan total  $Q$  reaksi pembentukan keadaan eksitasi sesuai pers. 8 s.d 13 diperlihatkan pada Gambar 9 s.d 11





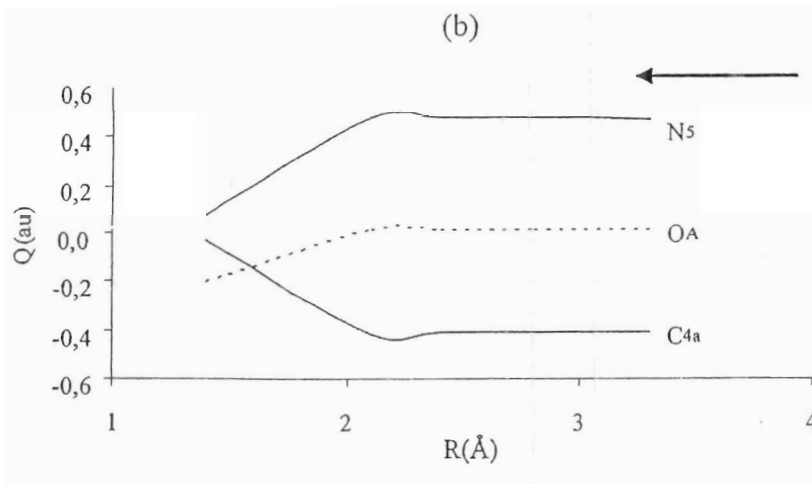
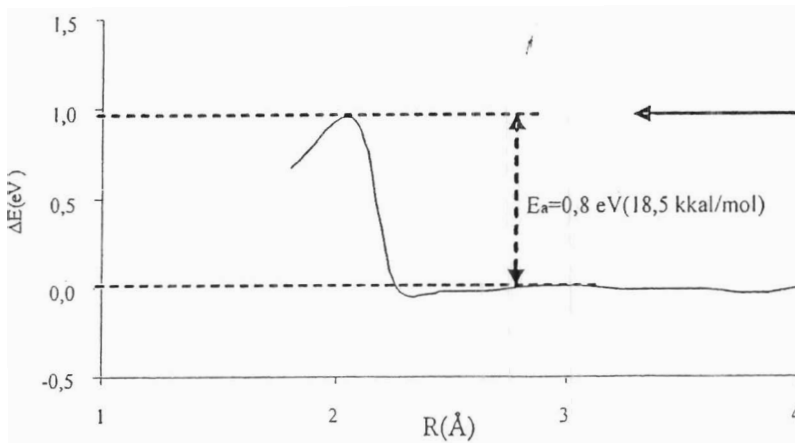
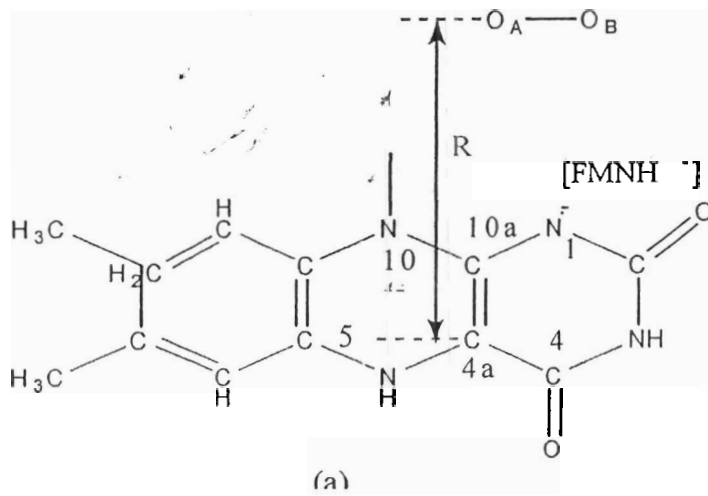
(b)



(c)

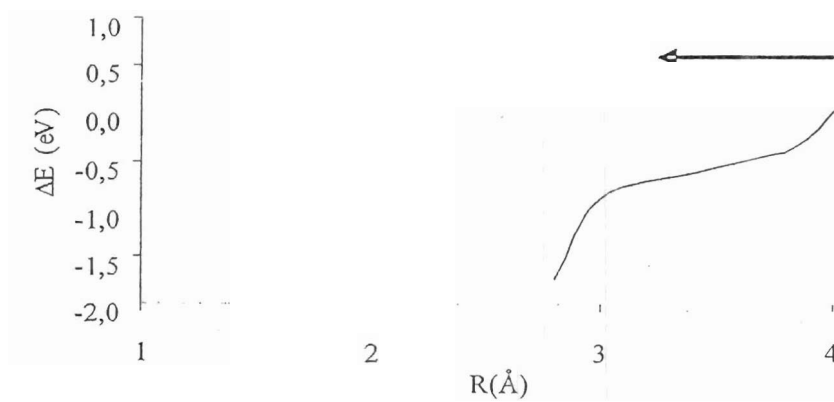
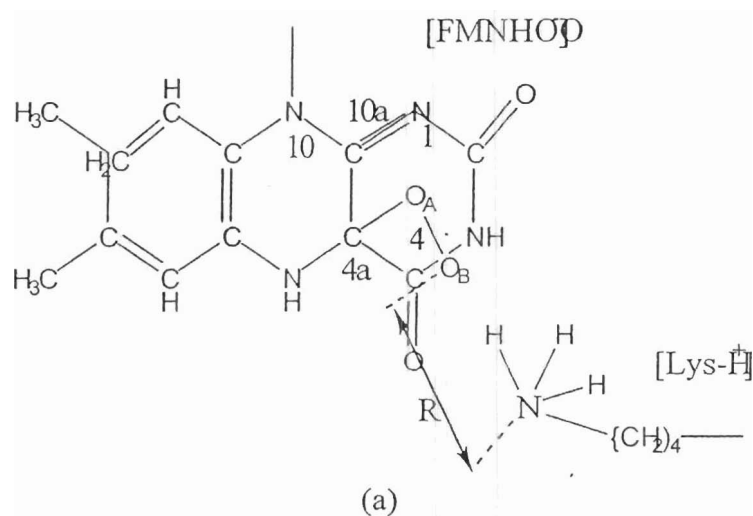
Gambar 9 a) Model interaksi Asn dan FMNH<sub>2</sub>, (b) kurva perbedaan energi potensial dan (c) muatan total untuk reaksi penambahan proton sesuai pers. 8 terhadap jarak molekul  $R$ . Tanda panah pada gambar menunjukkan arah pergerakan molekul Asn menuju sisi N<sub>1</sub> dari FMNH<sub>2</sub>.

Gambar 9 memperlihatkan bahwa sebuah proton ditransfer dari sisi N<sub>1</sub> dari FMNH<sub>2</sub> ke atom terminal O dari -CNH<sub>2</sub>O<sup>-</sup> dari rantai sisi Asn pada jarak  $R=2,4$  Å {Gambar 3(b)}. Transfer proton ini ditandai pengurangan muatan total secara drastis pada atom N<sub>1</sub> pada jarak  $R = 2,4$  Å dan pada saat yang sama terjadi perpindahan proton dari sisi N<sub>1</sub> dari FMNH<sub>2</sub> ke Asn {Gambar 9 (c)}. Perpindahan proton ke Asn hanya pada sisi N<sub>1</sub> dari FMNH<sub>2</sub> karena muatan total pada sisi lain dari FMNH<sub>2</sub> seperti pada sisi C<sub>4a</sub> adalah konstan. Energi barrier dari reaksi ini adalah 0,17 eV sedangkan molekul baru yang dihasilkan adalah FMNH<sup>-</sup>

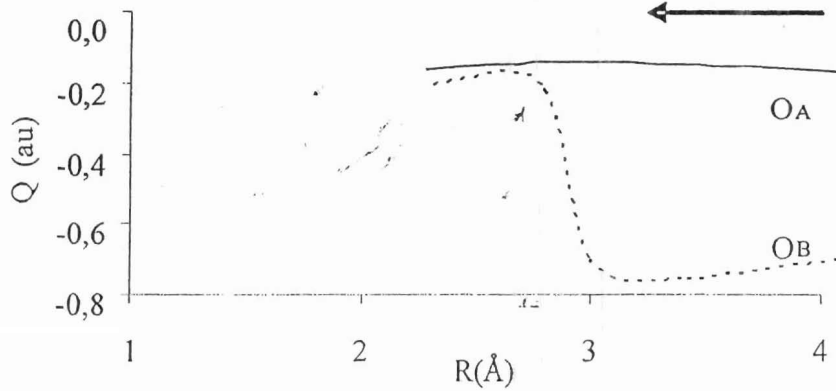


Gambar 10 (a) Model interaksi  $O_2$  dan  $FMNH^-$  (b) Kurva perbedaan energi potensial dan (c) muatan total untuk reaksi penambahan molekul  $O_2$  sesuai pers. 9 terhadap jarak molekul R. Tanda panah pada gambar menunjukkan arah pergerakan atom  $O_A$  menuju sisi  $C_{4a}$  dari  $FMNH^-$ .

Gambar10 memperlihatkan bahwa perbedaan energi potensial dan muatan total pada sisi N<sub>5</sub> dan C<sub>4a</sub> FMNH<sup>-</sup> sebagai fungsi dari R dimana R adalah jarak sisi C<sub>4a</sub> dari FMNH<sup>-</sup> dengan atom O<sub>A</sub> dari O<sub>2</sub>. Perbedaan energi potensial dihitung mulai pada jarak R = 4 Å dimana arah awal ikatan O-O diasumsikan paralel dengan bidang FMNH<sup>-</sup>. Besarnya energi barrier akibat reaksi ini adalah 0,8 eV pada R = 2 Å {Gambar10 b)}. Proton berpindah dari atom O<sub>A</sub> pada O<sub>2</sub> menuju sisi C<sub>4a</sub>. Perpindahan proton ditandai oleh penambahan muatan total di C<sub>4a</sub> dan pengurangan muatan di O<sub>A</sub> pada jarak R = 2Å. Penambahan O<sub>2</sub> menyebabkan sisi N<sub>5</sub> pada FMNH<sup>-</sup> ikut menyumbang muatan kepada sisi C<sub>4a</sub> {Gambar10c)}. Akibat penambahan O<sub>2</sub> ini pada FMNH<sup>-</sup> maka dihasilkan molekul baru FMNHOO<sup>-</sup>.



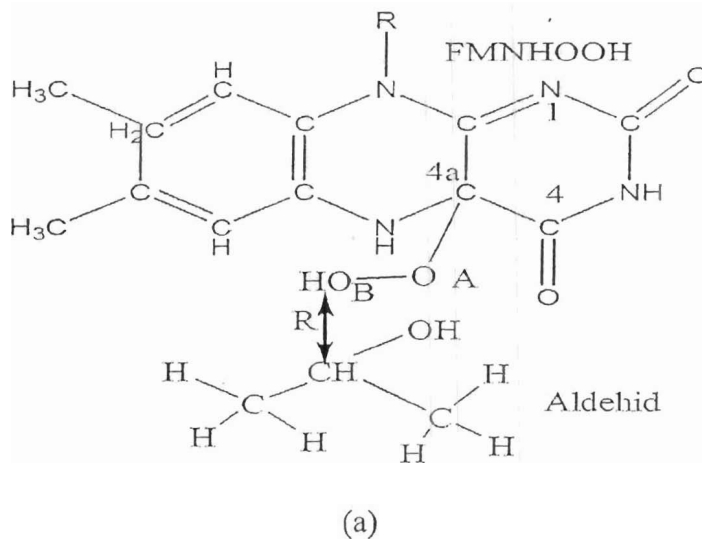


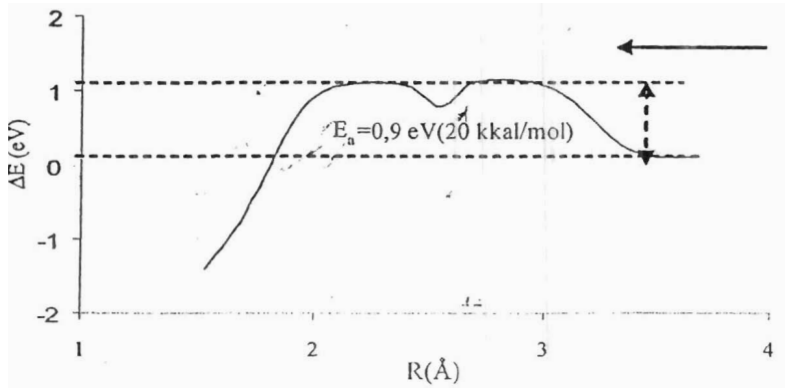


(c)

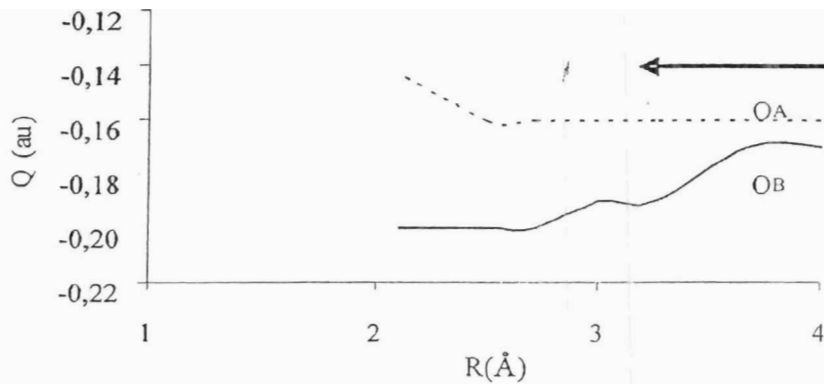
Gambar 11 a) Model interaksi Lys dan FMNHOO<sup>-</sup>, (b) Kurva perbedaan energi potensial dan (c) muatan total untuk reaksi pengikatan Lys sesuai pers. 10 terhadap jarak molekul R. Tanda panah pada gambar menunjukkan arah pergerakan molekul Lys-H<sup>+</sup> menuju atom O<sub>B</sub> pada FMNHOO<sup>-</sup>.

Gambar 11 memperlihatkan penurunan energi potensial secara drastis terjadi pada jarak R = 3 Å ketika residu LysH mendekati atom O<sub>B</sub>. Tidak ada energi barrier untuk reaksi Lys sehingga reaksi bersifat spontan {Gambar 11(b)}. Akibat reaksi ini adalah sebuah proton secara spontan bergerak dari LysH ke atom O<sub>B</sub> yang terikat pada FMNOO<sup>-</sup> pada R = 3 Å. Pada sisi lain muatan total di O<sub>B</sub> bertambah {Gambar 11(c)}. Akibat reaksi ini terbentuk molekul baru FMNHOOH.





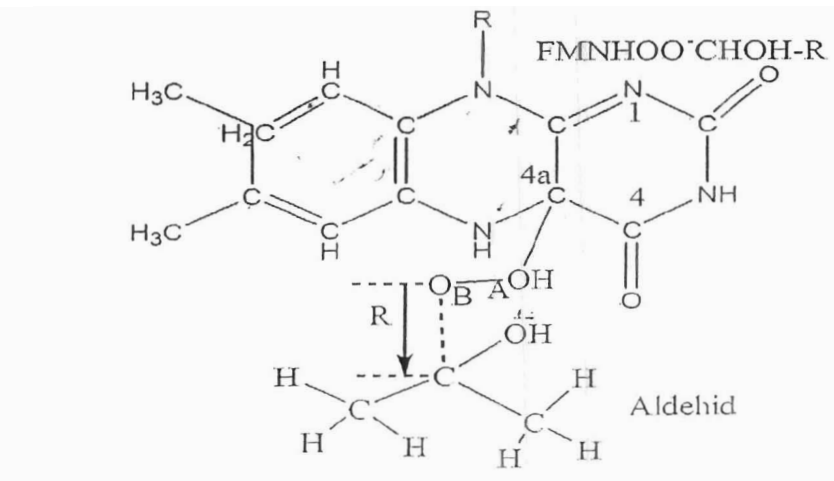
(b)



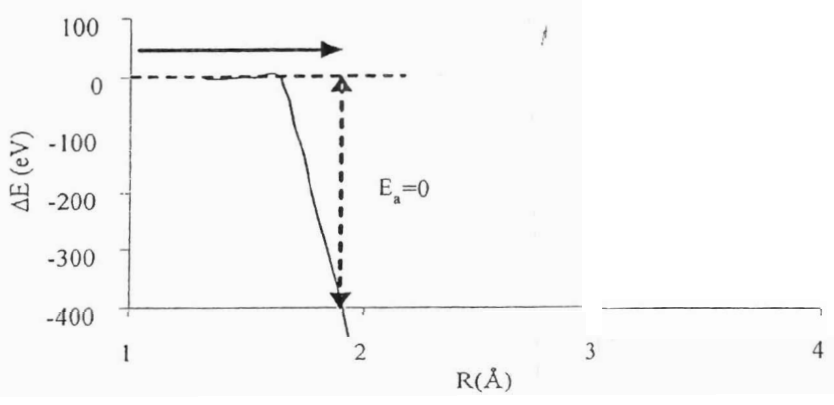
(c)

Gambar 12 (a) Model interaksi aldehyd dan FMNHOOH, (b) kurva perbedaan energi potensial dan (c) muatan total untuk reaksi penambahan aldehyd sesuai pers. 11 terhadap jarak molekul  $R$ . Tanda panah pada gambar menunjukkan arah pergerakan molekul Aldehyd menuju atom  $O_B$  pada FMNHOOH.

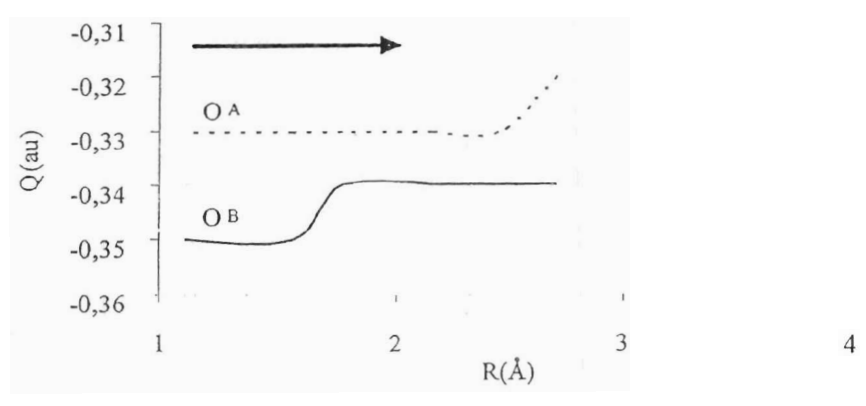
Gambar 12 memperlihatkan pengikatan atom terminal C dari RCOH dengan atom  $O_B$  dari molekul FMNHOOH dengan jarak  $R$ . Pada saat RCOH mendekati  $O_B$  pada jarak  $R=3,6 \text{ \AA}$  maka kurva energi potensial bertambah secara cepat dan maksimum pada energi potensial  $0,9 \text{ eV}$  {Gambar 12b}. Penambahan RCOH pada molekul FMNHOOH menyebabkan sebuah proton ditransfer dari atom  $O_B$  ke atom  $O_A$  yang ditandai penurunan muatan total di  $O_B$  {Gambar 12 c}. Molekul baru yang dihasilkan adalah FMNHOO-CHOH-R.



(a)



(b)

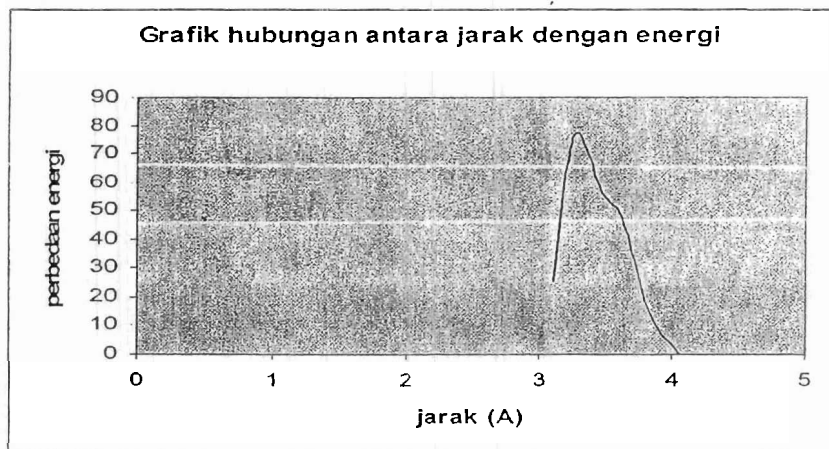
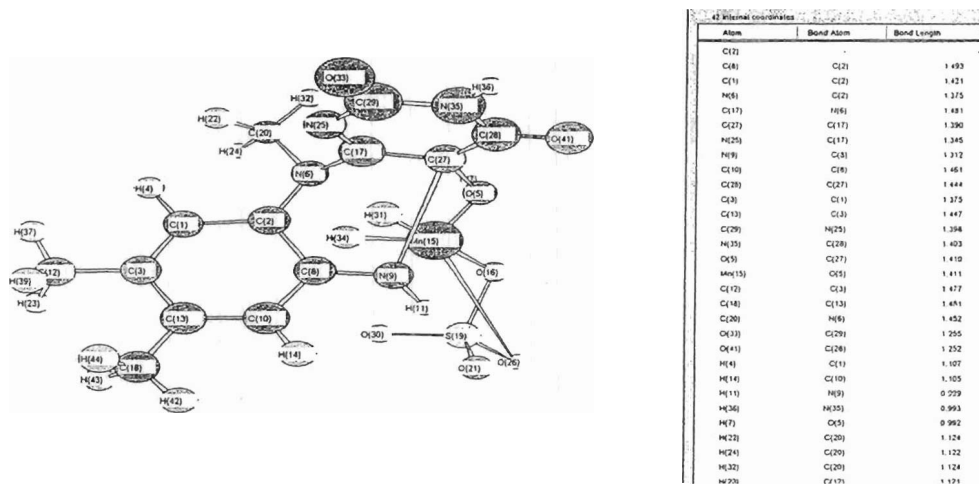


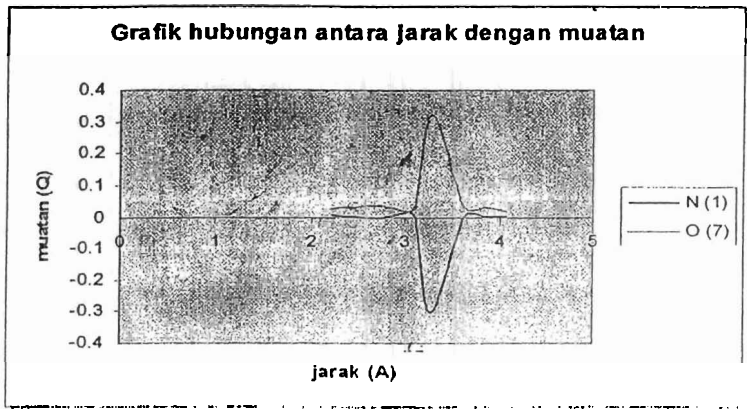
(c)

Gambar 13 a) Model interaksi RCOOH dan FMNHOO-CHOH-R, (b) Kurva perbedaan energi potensial dan (c) muatan total akibat pelepasan RCOOH dari FMNHOO-CHOH-R sesuai pers. 12 sebagai fungsi jarak R. Tanda panah pada gambar menunjukkan arah pergerakan molekul RCOOH menjauhi sisi  $O_A$  pada FMNHOO-CHOH-R.

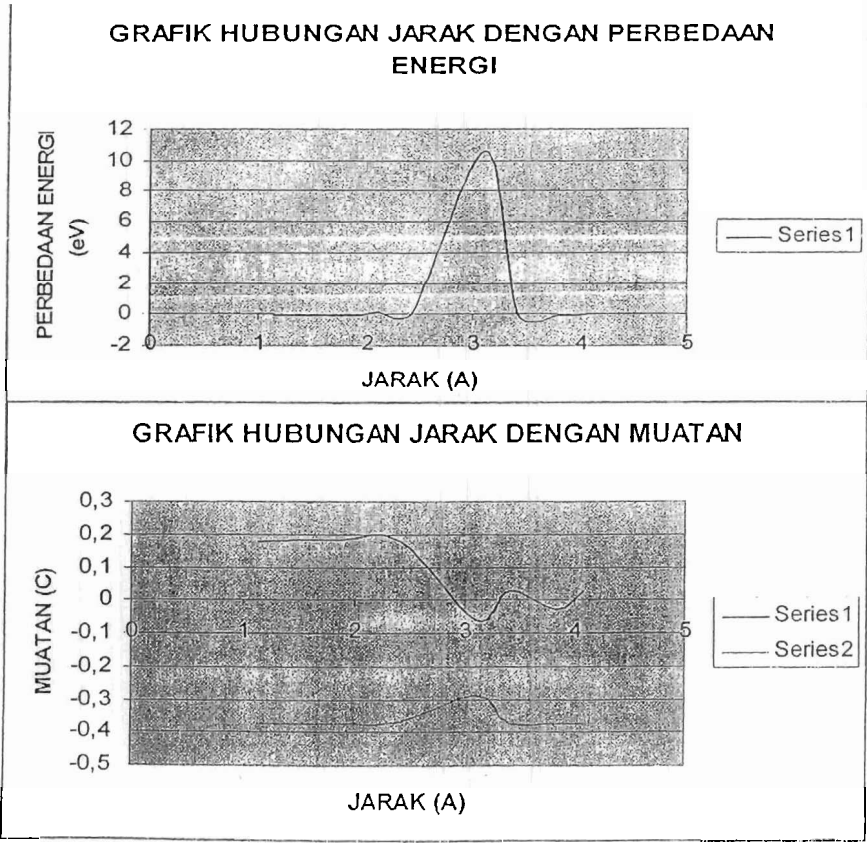
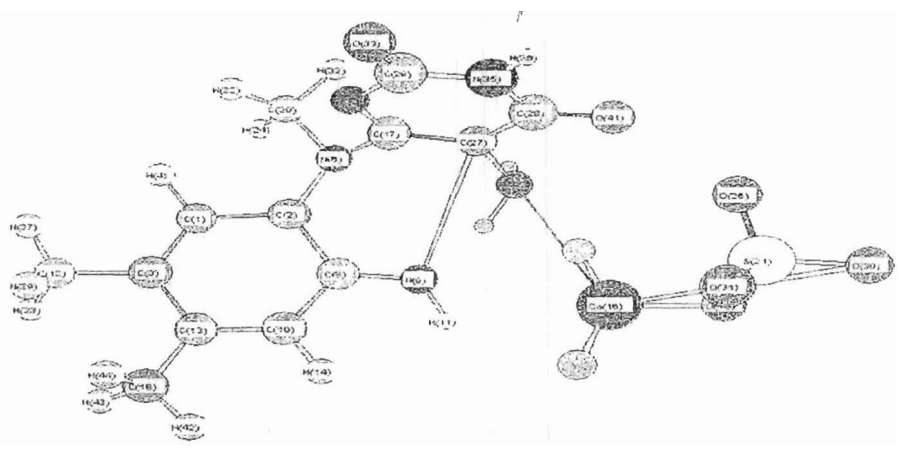
Gambar 13 memperlihatkan bahwa pelepasan molekul RCOOH dari FMNHOO-CHOH-R menyebabkan penurunan energi potensial secara drastis pada jarak  $R = 1,7 \text{ \AA}$  {Gambar 13b)}. Tidak ada energi barrier yang terjadi akibat reaksi pelepasan ini sehingga reaksi bersifat spontan. Akibat pelepasan molekul RCOOH pada molekul FMNHOO-CHOH-R menyebabkan atom  $O_B$  mendapatkan tambahan sebuah proton pada jarak  $1,7 \text{ \AA}$  dan atom  $O_A$  mendapatkan tambahan sebuah proton pada jarak  $R = 2,6 \text{ \AA}$  {Gambar 13c)}. Molekul baru yang dihasilkan adalah FMNHOH yang diduga sebagai molekul dalam keadaan eksitasi.

Gambar 14 memperlihatkan model interaksi senyawa beracun mangan sulfate pada keadaan eksitasi sistem bioluminisensi bakteri

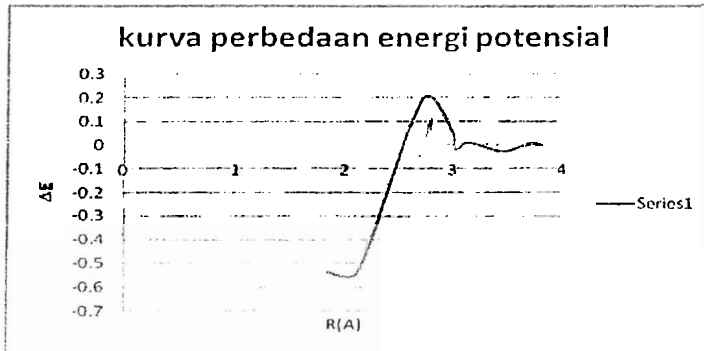
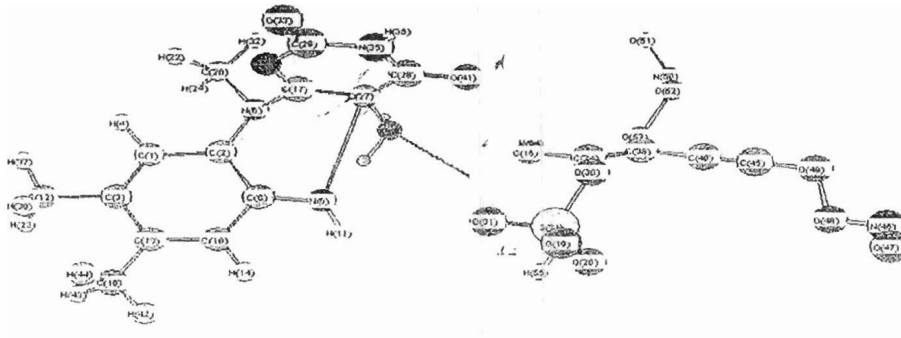




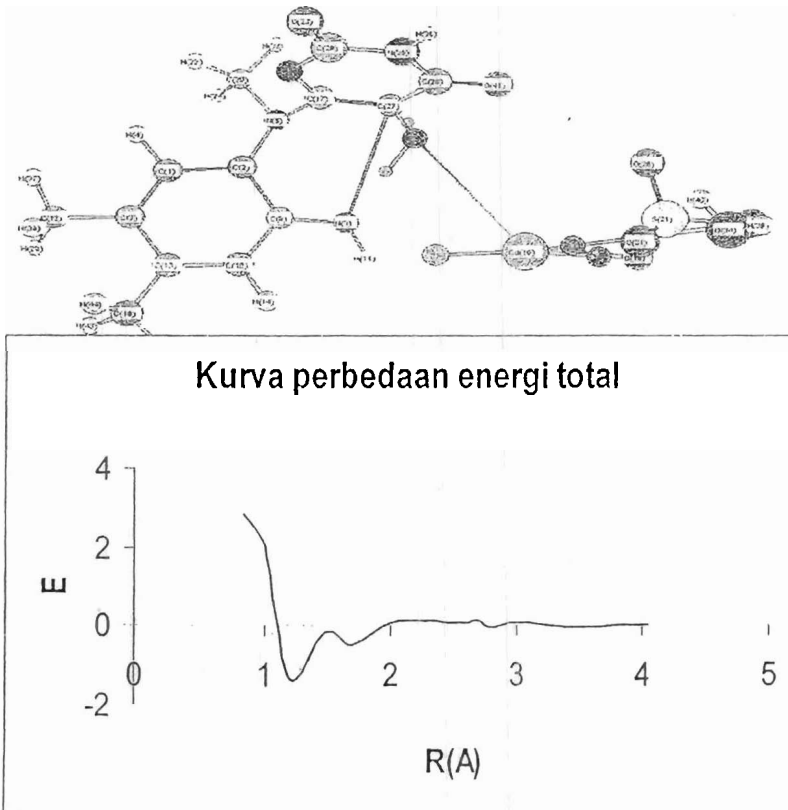
Gambar 15 memperlihatkan model interaksi senyawa beracun Cobalt sulfat pada keadaan eksitasi sistem bioluminisensi bakteri



Gambar 16 memperlihatkan model interaksi senyawa beracun Tembaga sulfat pada keadaan eksitasi sistem bioluminisensi bakteri

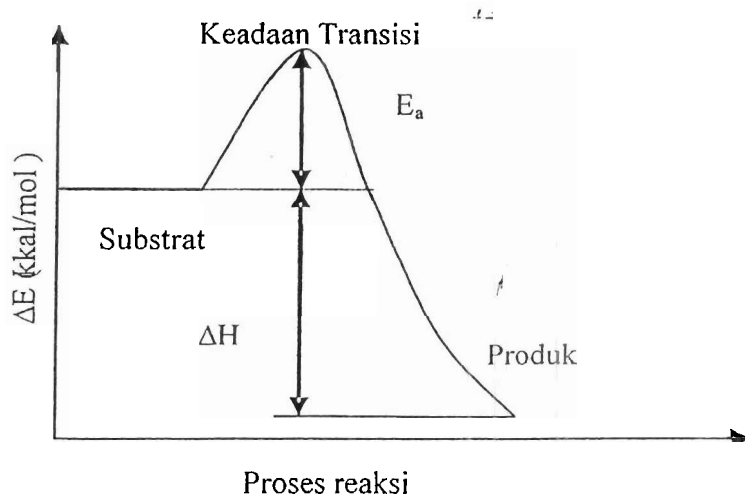


Gambar 17 memperlihatkan model interaksi senyawa beracun Tembaga sulfat pada keadaan eksitasi sistem bioluminisensi bakteri



### 3. Analisis landasan ilmiah pengaruh kation logam berat pada distribusi rapat elektron dalam sistem bioluminisensi bakteri *Photobacterium phosphoreum*.

Untuk mendapatkan model mekanisme senyawa beracun mempengaruhi pemancaran cahaya pada LBPP, digunakan model kurva reaksi digunakan Gambar 18.



Gambar 18 Kurva perbedaan energi potensial pada reaksi LBPP.

Suatu reaksi pada Gambar 18 dapat berlangsung bila molekul-molekul substrat mengalami keadaan aktif dengan energi aktivasi  $E_a$ . Dalam keadaan demikian ikatan dalam molekul dapat terputus atau bersatu sehingga memungkinkan terbentuknya produk. Keadaan molekul dimana substrat berada dalam keadaan aktif disebut keadaan transisi. Sedangkan energi aktivasi diartikan sebagai jumlah energi (dalam kalori) yang dibutuhkan oleh satu mol zat pada temperatur tertentu untuk membawa semua molekul (dari satu mol zat) ke keadaan aktifnya. Keadaan transisi memiliki energi bebas Gibbs, enthalpi dan energi potensial lebih tinggi dari keadaan yang berdekatan yang terletak pada lintasan tersebut. Berdasarkan Gambar 18 dapat dibuat profil energi potensial reaksi LBPP dengan terlebih dahulu menghitung enthalpi pembentukan ( $\Delta H_f$ ), substrat dan molekul baru yang terbentuk akibat reaksi sesuai pers. 8 s.d 13. Secara kuantum, enthalpi pembentukan standar  $\Delta H_f$  suatu senyawa diperoleh berdasarkan jumlah semua interaksi yang terjadi dalam molekul yaitu energi elektronik total ( $E_{elek}$ ), energi repulsif inti-inti ( $E_{nuc}$ ), energi

yang diperlukan untuk mengionisasi elektron valensi dari atom-atom  $\{E_{\text{isl}}(A)\}$  dan panas atomisasi  $\{E_{\text{atom}}(A)\}$ . Enthalpi pembentukan standar  $\Delta H_f$  dapat ditulis

$$\Delta H_f = E_{\text{elec}} + E_{\text{nuc}} + \sum_A E_{\text{isol}}(A) + \sum_A E_{\text{atom}}(A) \quad (14)$$

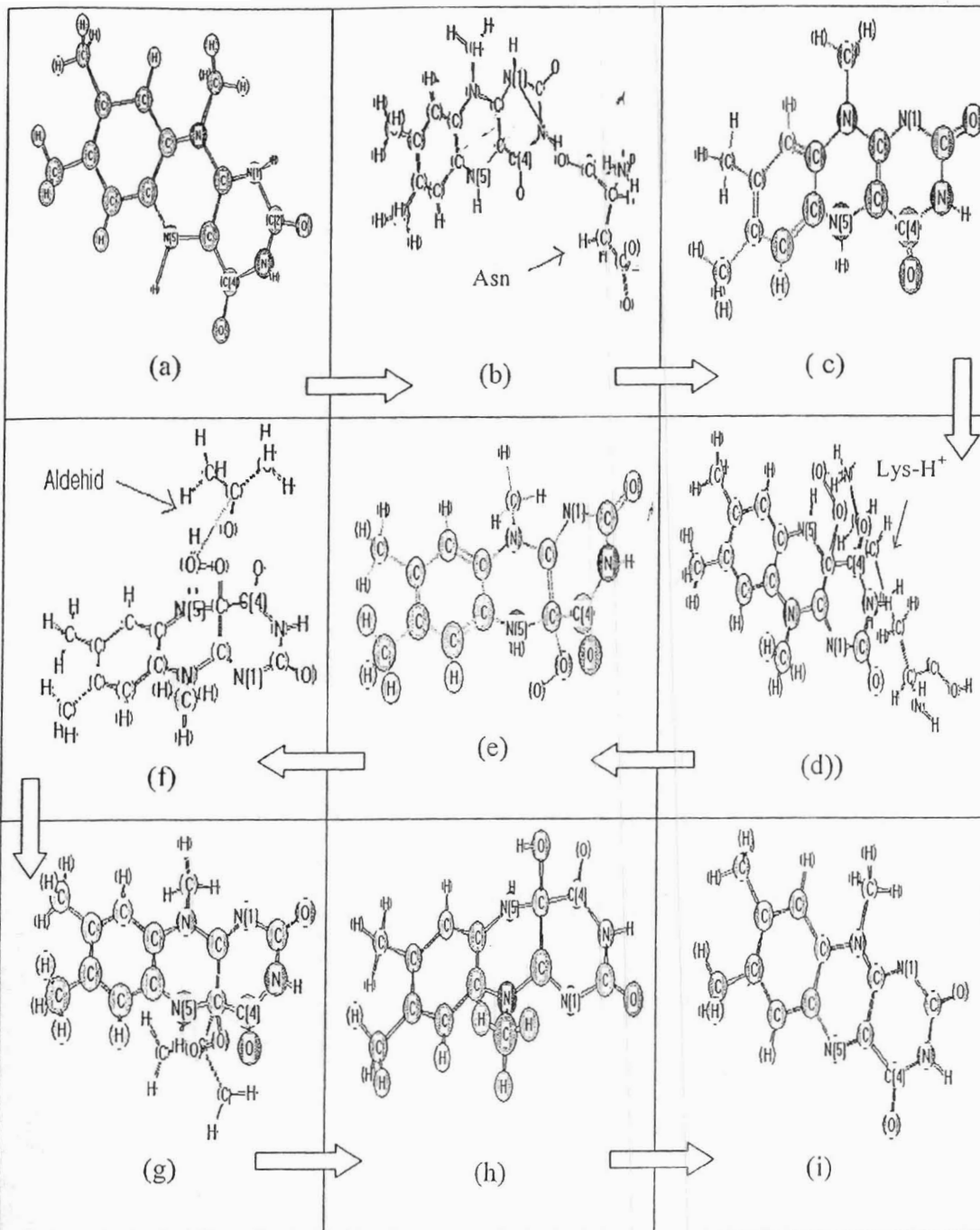
dimana A adalah atom ke-a. Perubahan enthalpi dari setiap keadaan intermediat (KI) dan energi barrier dari setiap keadaan transisi (KT). Berdasarkan perubahan enthalpi pembentukan dan energi barrier aktivasi dapat dihitung energi yang tersimpan dalam setiap keadaan intermediat yang dinyatakan dalam bentuk perubahan enthalpi reaksi  $\Delta H$  sebagai berikut

$$\Delta H = \Delta H_f(\text{produk}) - \Delta H_f(\text{reaktan}) \quad (15)$$

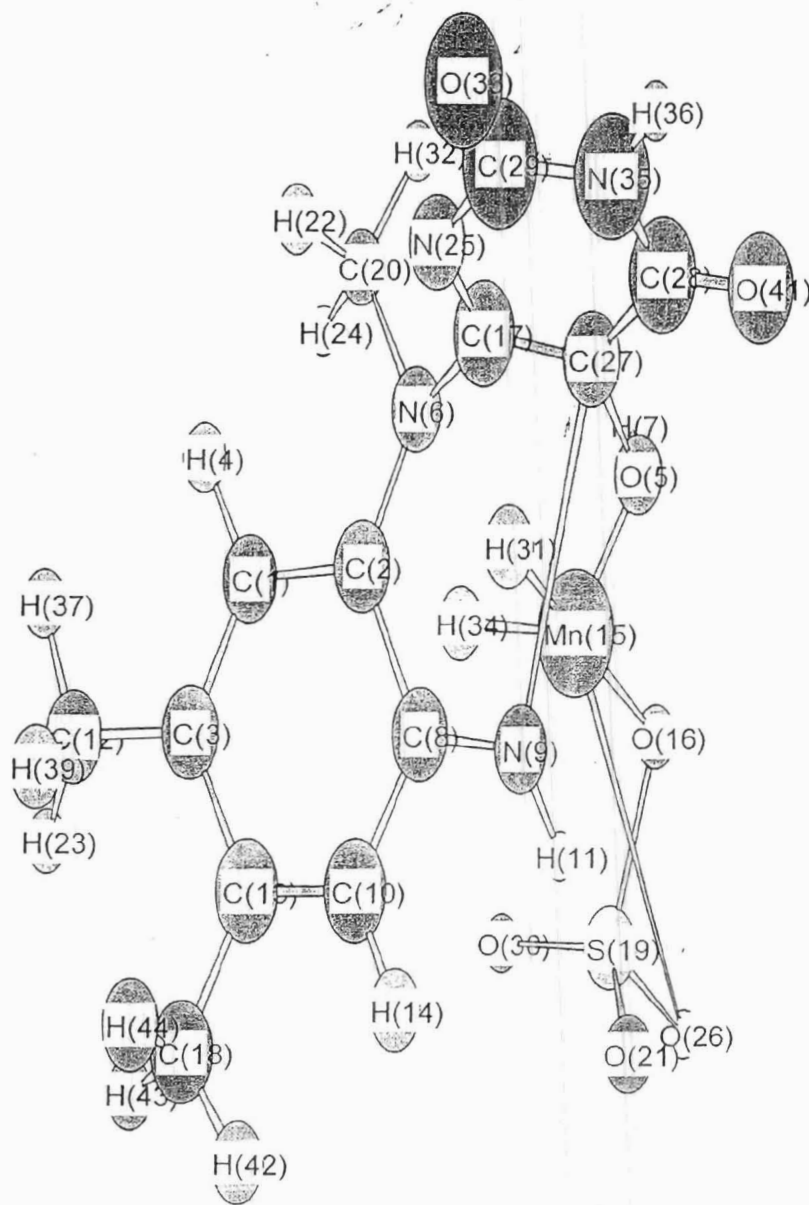
Selanjutnya jumlah energi pada setiap KI yang digunakan untuk melakukan kerja bioluminisensi dapat dihitung berdasarkan perubahan energi bebas Gibbs  $\Delta G$

Diagram energi hasil perhitungan  $\Delta H$  dan  $\Delta G$  setiap KI dapat dilihat pada Gambar 19





Gambar 19 Mekanisme model reaksi LBPP dalam kehadiran senyawa beracun , (a)  $\text{FMNH}_2$  ( $\Delta H_f = -82,28$  kkal/mol), (b) KT-1 ( $E_a = 3,9$  kkal/mol), (c) KI-1 ( $\Delta H_f = -84,86$  kkal/mol), (d) KT-2 ( $E_a = 18,5$  kkal/mol), (e) KI-2 ( $\Delta H_f = -87,120$  kkal/mol), (f) KT-3 ( $E_a = 20$  kkal/mol), (g) KI-3 ( $\Delta H_f = -97,50$  kkal/mol), (h) KE atau IV\* ( $E_a = 0$  kkal/mol,  $\Delta H_f = -97,5$  kkal/mol) dan (i) FMN ( $\Delta H_f = -17,28$  kkal/mol).



42 internal coordinates

Atom	Bond Atoms
C(2)	-
C(8)	C(2)
C(1)	C(2)
N(6)	C(2)
C(17)	N(6)
C(27)	C(17)
N(25)	C(17)
N(9)	C(8)
C(10)	C(8)
C(28)	C(27)
C(3)	C(1)
C(13)	C(3)
C(29)	N(25)
N(35)	C(28)
O(5)	C(27)
Mn(15)	O(5)
C(12)	C(3)
C(18)	C(13)
C(20)	N(6)
O(33)	C(29)
O(41)	C(28)
H(4)	C(1)
H(14)	C(10)
H(11)	N(9)
H(36)	N(35)
H(7)	O(5)
H(22)	C(20)
H(24)	C(20)
H(32)	C(20)
H(23)	C(12)

Gambar 20. Reaksi Bioluminisensi yang terkontaminasi logam berat Mangan sulfat

Kontaminasi Logam Berat Mangan (4,08 A)

13  
B  
ntaminasi Logam Berat Mangan (4,08 A).MOP

C	0.000000	0	0.000000	0	0.000000	0	0	0	0
C	1.416092	1	0.000000	0	0.000000	0	1	0	0
C	1.382355	1	122.942520	1	0.000000	0	1	2	0
C	5.272598	1	33.832275	1	192.310883	1	1	2	3
C	1.386963	1	121.461517	1	180.315979	1	2	1	3
C	1.482956	1	118.074615	1	2.390244	1	2	1	3
C	1.304810	1	120.216568	1	170.191254	1	6	2	1
C	1.459915	1	115.766571	1	352.107147	1	6	2	1
C	1.479568	1	120.571518	1	181.265427	1	3	1	2
C	1.428085	1	119.817902	1	3.580994	1	3	1	2
C	1.447586	1	119.597595	1	134.571991	1	5	2	1
C	1.483002	1	119.419235	1	175.478806	1	10	3	1
C	1.442337	1	118.952377	1	345.857910	1	5	2	1
C	1.370605	1	116.560394	1	328.372620	1	11	5	2
C	1.390915	1	66.295456	1	308.393936	1	4	1	2
C	1.453339	1	118.265213	1	132.585663	1	15	4	7
C	1.380295	1	118.342148	1	179.367538	1	14	11	5
C	1.262512	1	123.769577	1	180.632462	1	17	14	11
C	1.385391	1	116.742249	1	177.167877	1	16	15	4
C	1.264893	1	122.181915	1	357.350983	1	16	15	4
C	1.102676	1	118.843979	1	359.162460	1	1	2	5
C	0.969559	1	105.822678	1	239.070038	1	4	15	7
C	0.999100	1	114.304794	1	178.620911	1	7	6	2
C	1.101456	1	116.889114	1	187.707016	1	8	6	2
C	1.119202	1	110.354874	1	120.922974	1	9	3	1
C	1.117645	1	111.451202	1	0.547287	1	9	3	1
C	1.119461	1	110.339127	1	240.168106	1	9	3	1
C	1.117371	1	111.327057	1	178.858719	1	12	10	3
C	1.119507	1	109.924728	1	58.659622	1	12	10	3
C	1.118347	1	110.541962	1	299.387268	1	12	10	3
C	1.124222	1	112.008972	1	77.611923	1	13	5	2
C	1.122650	1	109.088928	1	316.848068	1	13	5	2
C	1.123260	1	108.957794	1	198.213913	1	13	5	2
C	0.991684	1	119.733978	1	177.132919	1	19	16	15
C	4.088257	1	143.174744	1	114.874817	1	4	15	7

Hasil pemodelan menjelaskan bagaimana keberadaan senyawa beracun mempengaruhi distribusi kerapatan elektron dari sistem bioluminisensi. Kation-kation dari senyawa beracun mempunyai peranan penting pada proses transfer elektron pada sistem bioluminisensi. Pola ini menjelaskan makin berat kation senyawa beracun maka makin besar pula penurunan energi aktivasi dari sistem bioluminisensi. Kation senyawa beracun berperan dalam distribusi kembali kerapatan elektron dan dalam pembentukan keadaan eksitasi elektron. Hasil ini mendukung hasil kajian eksperimen sebelumnya yang menyatakan bahwa aktivasi bioluminesensi diobservasi dalam kehadiran logam berat dengan nilai  $\Delta G^0$  (e) yang lebih tinggi, yang memperlihatkan kemungkinan paling rendah dari penggantian elektron dengan kation. Inhibisi bioluminisensi diobservasi dalam kehadiran logam berat  $\Delta G^0$  (e) yang lebih rendah.

## **VI. KESIMPULAN DAN SARAN**

### **1. Kesimpulan**

Hasil pemberian beberapa jenis senyawa beracun pada sistem bioluminisensi dari bakteri menyimpulkan bahwa kation dari logam berat berpartisipasi dalam distribusi kembali kerapatan elektron dan dalam pembentukan keadaan eksitasi elektron. Aktivasi bioluminesensi diobservasi dalam kehadiran senyawa beracun dengan kation yang lebih berat. Makin besar berat kation senyawa beracun maka akan menyebabkan makin besarnya penurunan energi aktivasi dari sistem bioluminisensi bakteri.

### **2. Saran**

Untuk keakuratan penelitian ini disarankan untuk melanjutkan penelitian ini untuk beberapa senyawa beracun lainnya dan memetakan kerapatan elektron sebelum dan sesudah diberi senyawa beracun

## DAFTAR PUSTAKA

- Arif, I dan Ratnawulan, (2006), Determination of Site Residues Involved In The Emission of Visible Light From *Photobacterium phosphoreum* Bacteria. Seminar Internasional ICMN (20 November 2006) MIPA, ITB.
- Ba,a, P.Grochowski, B. Lesyng, and J.A. McCammon. (1996) Quantum-Classical Molecular Dynamics. Models and Applications. In: M.Field, Editor, Quantum Mechanical Simulations Methods for Studying Biological System, Springer-Verlag Berlin Heidelberg and Les Editions de Physique Les Ulis, pages 115-196.
- Biron, K. (2003) : Fireflies, Dead Fish and a Glowing Bunny: a Primer on Bioluminescence, *J.Bio.Teach.*, **1**, 19 - 25.
- Floyd, E R., (1997), Bermuda Triangle Continues to Mystify. The Augusta Chronicle Online <http://www.augustachronicle.com/stories/030297>
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., dan Williams, S.T. (1994) : *Bergey's Manual of Determinative bacteriology*, 9<sup>th</sup> Edition, Williams & Wilkins, USA.
- Kruse, M, dan Boyle, R. (2000) : <http://library.thinkquest.org/COO5358/index2.htm?tqskip1=1&tqtime=0429>.
- Kudryasheva N.S., Shalayeva E.V., Zadorochnaya E.N., Stom D.J., Kratasyuk V.A., and Balayan A.E.,(1994), Patterns of bacterial bioluminescence inhibition in vitro by quinones and phenols-component of sewage, *Biofizika* Vol. 39, p.455-464.
- Meyer-Rochow, V.B. (2001) : Light of My Life-Messages in The Dark. *Biologist (London)* **48**, 163 – 165.
- Ratnawulan., Arif,I., Sukirno dan Loeksmanto,W. (2006a) : Formation of Excitation Condition at *Photobacterium phosphoreum* That Isolated From The Indonesian marine Squid. Photochemistry and Photobiology American Society for Photobiology (submitted)
- Ratnawulan., Arif,I., Sukirno dan Loeksmanto,W. (2006b) : Spectral Properties of Bacteria Symbiosis in Luminous Organ of The Squid *Loligo Duvaceuli*, *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence* (Accepted).
- Ratnawulan, Pringgenis,D., dan Arif, I. (2005) : Isolasi dan Identifikasi Bahan Aktif Penyebab Pemancaran cahaya Pada Bakteri *Photobacterium phosphoreum* yang di isolasi dari Cumi laut Indonesia, *J. Makara Seri Sains*, Vol. 9(1), FMIPA Universitas Indonesia.
- Ratnawulan. , Papilaya, E., Arif, I., Sukirno dan Loeksmanto, W. (2004) : Pola Dan Aktivitas Dari Bakteri Bioluminisensi Yang Diisolasi Dari Cumi-Cumi Laut Indonesia, *The First, Jogja Regional Physics Conference, Proceedings*, September 11, 2004.

- Ratnawulan, Arif, I dan Umar, L (2008) : Perubahan Perilaku Parameter Fisis Bioluminisensi dari Bakteri *Photobacterium phosphoreum*, Seminar Nasional Fisika ke-9, 24 Agustus 2008, Padang.
- Papilaya,E., Ratnawulan dan Arif, I., 2004, (Heavy) metal effect to light bacterial luminescent *Photobacterium phosphoreum*, Proceedings of 2004 Annual Physics Seminar, September 30- October 1
- Pringgenies, D., Sastrodiharjo, S., Nganro, N.R., dan Aryantha, I.N., (2001), Bacteria symbiosis in luminous organ of the squid *Loligo duvaucel* and cuttlefish *Sepia esculenta*, Phuket Marine Biology Centre (Thailand). Spec. Publ. Vol. 22. No.11, p.145-146
- Wada,N., Sugimoto., T., Watanabe,H., and Tu,S.C., 1999, Computational Analysis of the Oxygen Addition at the C4a Site of Reduced Flavin in the Bacterial Luciferase Bioluminescence Reaction, *Photochemistry and Photobiology*, 70(1): 116–122



11

## LAMPIRAN PENELITIAN

Kontaminasi Cd (3,49A) .

aminasi Cd (3,49A).MOP

0.000000	0	0.000000	0	0.000000	0	0	0	0
1.420883	1	0.000000	0	0.000000	0	1	0	0
1.375107	1	123.250259	1	0.000000	0	1	2	0
4.908813	1	5.717682	1	204.433441	1	1	2	3
1.374802	1	121.809479	1	180.775848	1	2	1	3
1.492630	1	117.037750	1	4.811951	1	2	1	3
1.312057	1	122.356766	1	166.886536	1	6	2	1
1.460663	1	116.777206	1	350.377853	1	6	2	1
1.477203	1	120.776093	1	179.105255	1	3	1	2
1.446655	1	119.947296	1	1.613892	1	3	1	2
1.481247	1	116.210693	1	120.024231	1	5	2	1
1.481247	1	119.240891	1	174.700714	1	10	3	1
1.452408	1	117.674210	1	343.264832	1	5	2	1
1.344727	1	116.674057	1	280.352783	1	11	5	2
1.454910	1	71.930954	1	262.145355	1	4	1	2
1.444214	1	119.066040	1	125.032013	1	15	4	7
1.398453	1	116.922348	1	183.117126	1	14	11	5
1.255081	1	121.877670	1	180.775848	1	17	14	11
1.402893	1	114.666733	1	190.522141	1	16	15	4
1.251800	1	125.556580	1	10.431717	1	16	15	4
1.106537	1	118.959381	1	357.569550	1	1	2	5
0.991974	1	106.999435	1	117.515091	1	4	15	7
0.991989	1	106.999435	1	0.316483	1	4	15	7
0.998886	1	118.090363	1	180.632462	1	7	6	2
1.104614	1	117.516846	1	188.500839	1	8	6	2
1.120544	1	109.933472	1	121.332123	1	9	3	1
1.118179	1	111.694244	1	0.774597	1	9	3	1
1.120834	1	110.087341	1	240.283508	1	9	3	1
1.117783	1	111.549118	1	177.923248	1	12	10	3
1.119644	1	110.157288	1	57.365723	1	12	10	3
1.120270	1	109.936966	1	298.203506	1	12	10	3
1.123657	1	113.565170	1	65.380966	1	13	5	2
1.122482	1	108.548645	1	303.129120	1	13	5	2
1.123688	1	107.537994	1	184.874390	1	13	5	2
0.993423	1	119.125488	1	180.000366	1	19	16	15
3.492630	1	132.694061	1	274.712036	1	4	15	7
2.168442	1	129.055374	1	278.597260	1	36	4	15
1.692963	1	111.230881	1	61.838455	1	37	36	4
1.453690	1	108.489182	1	291.351028	1	38	37	36
4.703949	1	120.491089	1	298.535736	1	36	4	15
1.454697	1	108.309097	1	58.010925	1	38	37	36
1.831985	1	54.977234	1	108.985764	1	36	4	15



Fmn tereksitasi

N	19	.000000					
O	20	2.267536	.000000				
H	21	6.358083	7.476340	.000000			
H	22	4.152194	3.294058	5.652489	.000000		
H	23	4.640467	4.234109	4.789771	2.464523	.000000	
H	24	5.235916	4.943809	5.378610	4.024680	1.657370	.000000
H	25	6.889292	7.123367	4.940924	5.990080	3.557671	2.394084
H	26	9.228681	10.185964	3.416878	8.278348	6.667710	6.580679
H	27	8.354480	9.576799	2.273574	7.809931	6.584022	6.779646
H	28	8.576733	9.840452	3.387893	8.462673	6.824271	6.587151
H	29	8.735263	9.291832	5.520226	8.129488	5.778312	4.722149
H	30	9.388022	10.066910	4.876824	8.454627	6.326520	5.671679
H	31	8.700379	9.662134	4.852007	8.584593	6.447194	5.639698
H	32	5.236672	6.420541	2.114513	4.731495	4.825568	5.873370
H	33	6.093971	6.708364	2.414949	4.197563	4.309889	5.544008
H	34	4.888946	5.551573	3.550976	3.467508	4.393811	5.807542
H	35	.999845	2.486301	7.297502	4.958941	5.530514	6.024797

H 25                  H 26                  H 27                  H 28                  H 29                  H 30

H	25	.000000					
H	26	4.879672	.000000				
H	27	5.532837	1.772510	.000000			
H	28	4.907028	1.771598	1.774437	.000000		
H	29	2.332916	3.975447	5.112613	3.940032	.000000	
H	30	3.434393	2.448929	3.937019	2.952516	1.771254	.000000
H	31	3.462091	3.090269	3.976903	2.451159	1.772813	1.768951
H	32	6.241950	5.514772	4.210776	5.374592	7.314852	6.899170
H	33	5.951082	5.298112	4.411841	5.713925	7.135907	6.593191
H	34	6.759197	6.814474	5.746828	6.912340	8.238359	7.963465
H	35	7.705175	10.147468	9.249952	9.413693	9.531534	10.260356

H 31                  H 32                  H 33                  H 34                  H 35

H	31	.000000					
H	32	6.764229	.000000				
H	33	6.906349	1.784261	.000000			
H	34	8.011729	1.789511	1.775218	.000000		
H	35	9.486868	6.134970	7.056121	5.776357	.000000	

EIGENVALUES

43234	-40.35084	-38.36404	-37.42217	-35.81942	-33.74583	-33.00240	-31.00176
39939	-28.44789	-26.84600	-26.14175	-24.73946	-23.46677	-22.21773	-21.65219
06072	-20.05627	-19.71916	-19.59711	-18.15516	-18.04076	-17.63807	-17.19069
77458	-16.66034	-16.28595	-16.02848	-15.91707	-15.30481	-15.18388	-15.03923
90040	-14.70750	-14.40419	-13.77208	-13.62841	-13.61553	-13.53830	-13.27839
90108	-12.71348	-12.63664	-12.50804	-12.34673	-11.65645	-11.22235	-10.81317
69159	-10.44667	-9.25709	-8.30434	-6.53137	-.70591	.03608	.22178
26240	.35884	.84357	1.28955	1.47607	1.98678	2.35915	2.55487
92268	3.13697	3.14320	3.26523	3.48426	3.54730	3.63508	3.72480
85674	3.88090	3.93908	4.11702	4.16480	4.22082	4.25474	4.29049
81801	4.38205	4.59882	4.61043	4.81315	4.98693	5.23249	5.44852
57539	5.74787	5.76874	6.10573	6.31290	6.41778	6.54531	

NET ATOMIC CHARGES AND DIPOLE CONTRIBUTIONS

ATOM NO.	TYPE	CHARGE	ATOM ELECTRON DENSITY
1	C	-.0910	4.0910



		Fmn tereksitasi		
20	O	6.6338	-1.3379	-2.0775
21	H	-.5435	-.9578	-.0192
22	H	5.0226	-1.5184	.7899
23	H	3.9319	4.6711	.4898
24	H	3.8032	2.2087	-.1153
25	H	1.7412	3.4231	-.0435
26	H	-2.6634	1.5542	.9143
27	H	-2.6040	-.0003	.0647
28	H	-2.7051	1.5130	-.8563
29	H	-.2946	4.5546	-.1767
30	H	-1.5915	3.7474	.7199
31	H	-1.5627	3.6733	-1.0473
32	H	.5940	-2.7032	-.3807
33	H	.9357	-2.3119	1.3262
34	H	2.0798	-3.3124	.4089
35	H	5.3953	-1.9896	-4.1325

ATOMIC ORBITAL ELECTRON POPULATIONS

1.17493	.92731	.97961	1.00913	1.18824	.93338	.90032	1.09729
1.17580	.95394	.93458	1.03202	1.78239	1.83429	1.35534	1.21535
1.43150	1.24733	.96200	1.30549	1.19516	.95221	.93002	.98613
1.38028	.94857	1.09319	1.53709	1.17873	.94202	.96334	1.05699
1.12343	.91949	1.00970	1.00666	1.17477	.94197	.94349	.98036
1.22927	.92013	.94263	.93884	1.12378	.99219	.94321	1.00867
1.15191	.98917	.93374	1.01684	1.62093	1.40281	1.08586	.97450
1.21263	.90951	.95482	.90270	1.18870	.88555	.81839	.85839
1.21763	.84807	.80980	.88113	1.86070	1.75743	1.35243	1.31870
1.34830	.99436	1.65606	1.05107	1.86552	1.18617	1.41999	1.83963
.89073	.76854	.93608	.96289	.88595	.95406	.95725	.95285
.95439	.95176	.95059	.94608	.93895	.95792	.87595	



fmn eksitasi

51 Perhitungan reaksi bioluminisensi Photobacterium phosp. dalam keadaan eksitasi

FINAL HEAT OF FORMATION	=	-55.76467	KCAL
TOTAL ENERGY	=	-3300.54972	EV
ELECTRONIC ENERGY	=	-23178.53139	EV
CORE-CORE REPULSION	=	19877.98167	EV
IONIZATION POTENTIAL	=	10.09707	
NO. OF FILLED LEVELS	=	52	
AND NO. OF OPEN LEVELS	=	1	
MOLECULAR WEIGHT	=	275.287	
COMPUTATION TIME	=	0 h 2 min 33 sec	

Kontaminasi Cd (4,08A)

Kontaminasi Kobalt pada jarak antar molekul 4,08 A

FINAL HEAT OF FORMATION	=	-185.98869	KCAL
TOTAL ENERGY	=	-4699.18200	EV
ELECTRONIC ENERGY	=	-36300.87460	EV
CORE-CORE REPULSION	=	31601.69260	EV
IONIZATION POTENTIAL	=	8.46327	
NO. OF FILLED LEVELS	=	69	
MOLECULAR WEIGHT	=	484.762	
COMPUTATION TIME	=	0 h 2 min 27 sec	

LAMPIRAN MAKALAH SEMINAR & PUBLIKASI

# KAJIAN TINGKAT ENERGI SISTEM BIOLUMINISSENSI BAKTERI *PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM* SEBELUM TERKONTAMINASI LOGAM BERAT

*Ratnawulan,*  
Jurusan Fisika FMIPA Universitas Negeri Padang

e-mail: [ratna\\_unp@yahoo.com](mailto:ratna_unp@yahoo.com)

## ABSTRAK

Telah dilakukan kajian teoritik tentang mekanisme logam berat mempengaruhi sistem bioluminisensi dari bakteri *Photobacterium phosphoreum*. Hasil penelitian menemukan bahwa kehadiran logam berat mempengaruhi proses transfer elektron dari sistem bioluminisensi. Kation pada logam berat berpartisipasi dalam distribusi kembali kerapatan elektron dan pembentukan keadaan eksitasi elektron pada sistem bioluminisensi. Pola ini menjelaskan bahwa aktivasi bioluminesensi diobservasi dalam kehadiran logam berat dengan nilai  $\Delta G^0$  (e) yang lebih tinggi, yang memperlihatkan kemungkinan paling rendah dari penggantian elektron dengan kation. Inhibisi bioluminisensi diobservasi dalam kehadiran logam berat  $\Delta G^0$  (e) yang lebih rendah

*Kata kunci : aktivasi, berat molekul, inhibisi, logam berat, parameter fisis bioluminisensi.*

## I. Pendahuluan

## II. Tinjauan Energi pada Sistem Bioluminisensi

Dari sudut pandang energi, reaksi bioluminisensi terjadi ketika sebagian besar energi kimia yang eksoterm  $\Delta H$  diubah menjadi energi eksitasi elektronik  $\Delta H^*$  yang meluruh ke keadaan dasar sambil memancarkan cahaya tampak ( $h\nu$ ). Secara ringkas prosesnya dapat dirumuskan sebagai berikut



Langkah  $\Delta H \rightarrow \Delta H^*$  disebut langkah pembentukan keadaan eksitasi (kemieksitasi) dan langkah  $\Delta H^* \rightarrow h\nu$  disebut langkah proses pemancaran cahaya (kemiluminisensi). Persyaratan energi ditentukan berdasarkan kriteria dari Garcia dkk. (2001) sebagai berikut

$$-\Delta G \geq hc/\lambda \quad (2)$$

dimana  $\Delta G$  adalah perubahan energi bebas Gibbs,  $h$  adalah konstanta Planck ( $6,626 \times 10^{-34}$  J.s),  $c$  adalah kecepatan penjalaran cahaya dalam ruang vakum ( $3 \times 10^8$  m.s<sup>-1</sup>) dan  $\lambda$  adalah panjang gelombang cahaya yang dipancarkan.

Hubungan antara perubahan energi bebas Gibbs  $\Delta G$  dengan perubahan enthalpi  $\Delta H$  dapat ditulis

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (3)$$

Perubahan entropi  $\Delta S$  dapat dinyatakan dalam persamaan empiris (Lehrer dan Barker, 1970 dikutip dari Tu, 1979) sebagai berikut

$$\Delta S = 4,6 (\log k - 10,7 - \log T) \quad (4)$$

dimana  $k$  adalah konstanta peluruhan dan  $T$  adalah temperatur reaksi pada skala Kelvin. Hubungan perubahan enthalpi pada keadaan eksitasi  $\Delta H^*$  dengan energi aktivasi  $E_a$  dapat ditulis sebagai berikut

$$\Delta H^* = E_a + RT \quad (5)$$

Sedangkan hubungan perubahan energi bebas Gibbs pada keadaan eksitasi  $\Delta G^*$  dengan perubahan enthalpi pada keadaan eksitasi  $\Delta H^*$  dapat dinyatakan sebagai berikut

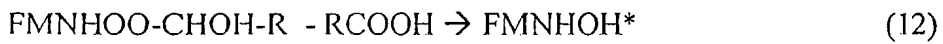
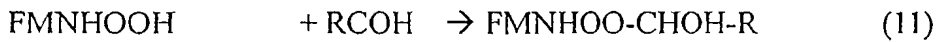
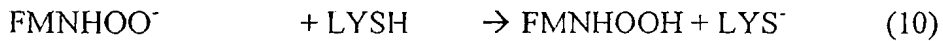
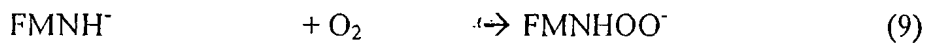
$$\Delta G^* = \Delta H^* - T\Delta S^* \quad (6)$$

Sedangkan perubahan entropi pada keadaan eksitasi  $\Delta S^*$  dapat dinyatakan dalam persamaan empiris (Lehrer dan Barker, 1970 dikutip dari Tu, 1979) sebagai berikut



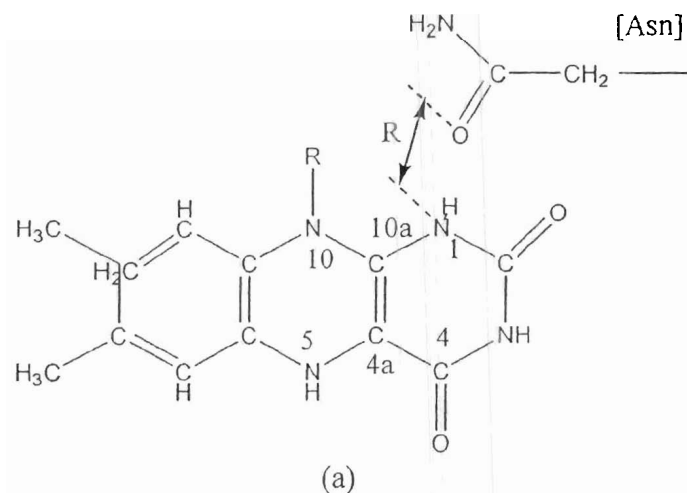
$$\Delta S^* = 4,6 \{ \log k - 10,7 - \log T + E_a / (4,6 T) \} \quad (7)$$

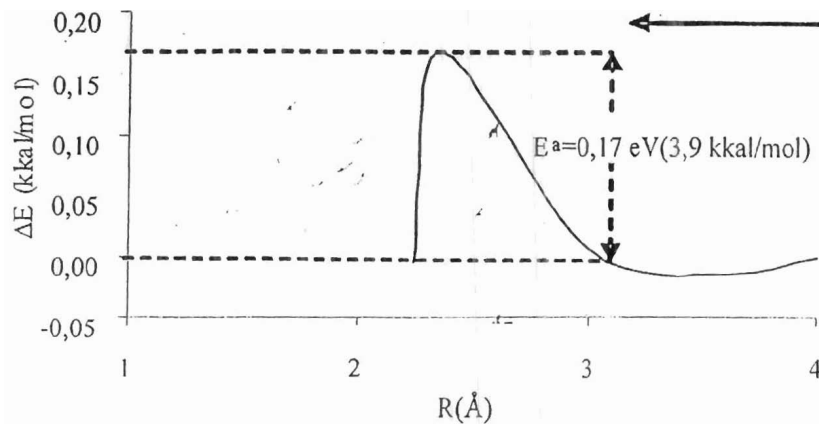
Untuk mendapatkan tingkat energi sistem bioluminisensi sebelum terkontaminasi logam berat, digunakan model persamaan reaksi sistem bioluminisensi sebagai berikut:



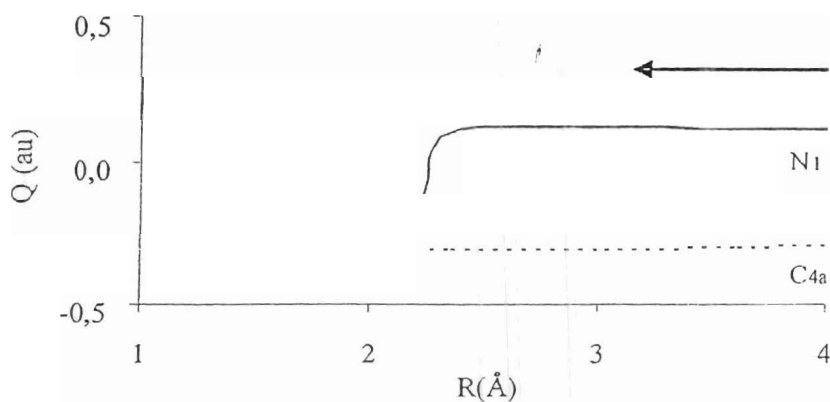
Setiap persamaan dihitung perubahan energi potensial terhadap jarak antar molekul akibat proses reaksi. Dengan asumsi bahwa reaksi bioluminisensi pada bakteri *Photobacterium phosphoreum* adalah reaksi redoks yang melibatkan perpindahan elektron atau proton, maka dapat juga ditinjau perubahan muatan pada sisi pengikatan substrat. Contoh perhitungan perbedaan energi potensial  $\Delta E$  dan muatan total  $Q$  pers. V.21 pada jarak antar molekul  $R = 3,9 \text{ \AA}$  dapat dilihat pada Lampiran H.

Kurva perbedaan energi potensial  $\Delta E$  dan muatan total  $Q$  reaksi pembentukan keadaan eksitasi sesuai pers. V.21 s.d V.25 diperlihatkan pada Gambar V.12 s.d V.14.



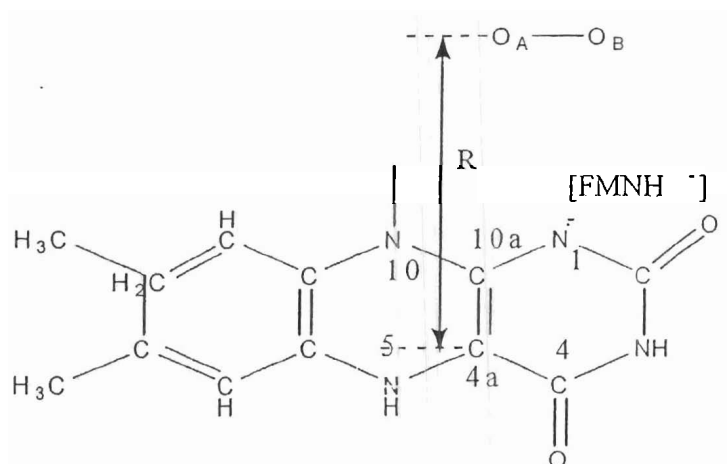


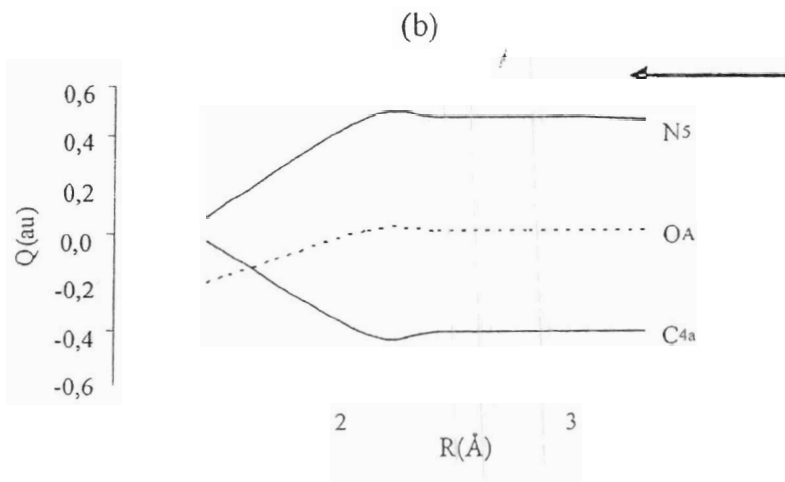
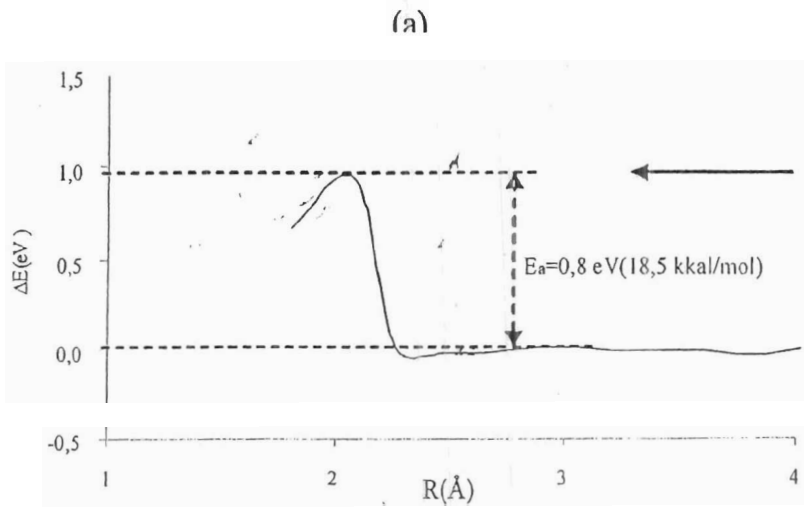
(b)



(c)

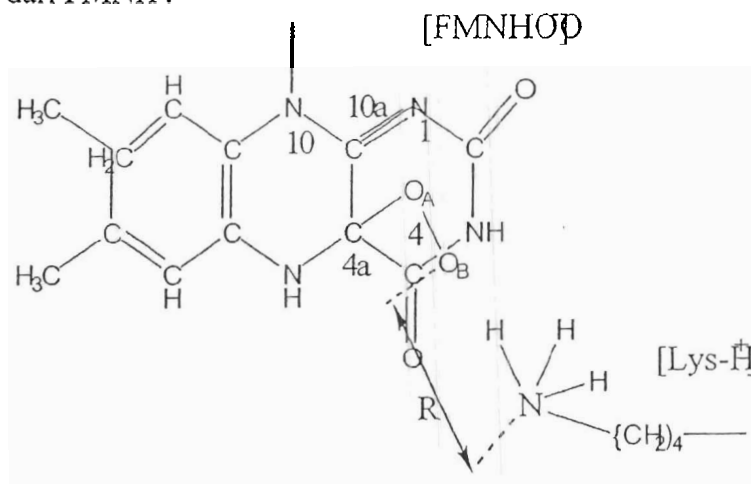
Gambar V.10(a) Model interaksi Asn dan FMNH<sub>2</sub>, (b) kurva perbedaan energi potensial dan (c) muatan total untuk reaksi penambahan proton sesuai pers. V.21 terhadap jarak molekul  $R$ . Tanda panah pada gambar menunjukkan arah pergerakan molekul Asn menuju sisi  $N_1$  dari FMNH<sub>2</sub>.

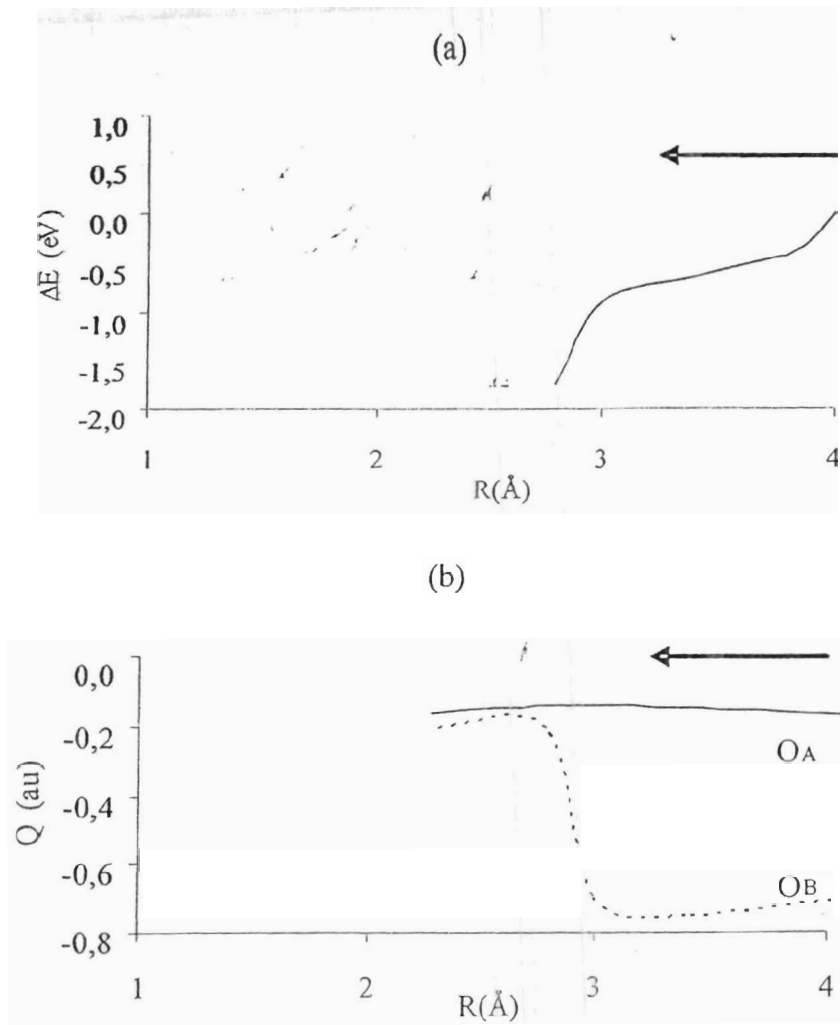




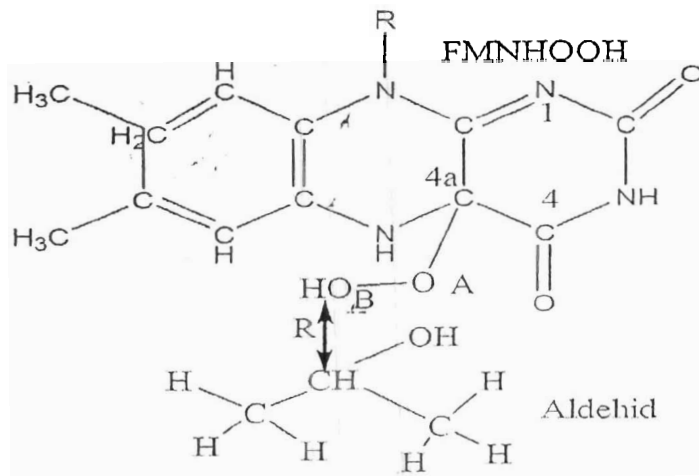
(c)

Gambar V.11 (a) Model interaksi  $O_2$  dan  $FMNH^-$  (b) Kurva perbedaan energi potensial dan (c) muatan total untuk reaksi penambahan molekul  $O_2$  sesuai pers. V.22 terhadap jarak molekul  $R$ . Tanda panah pada gambar menunjukkan arah pergerakan atom  $O_A$  menuju sisi  $C_{4a}$  dari  $FMNH^-$ .

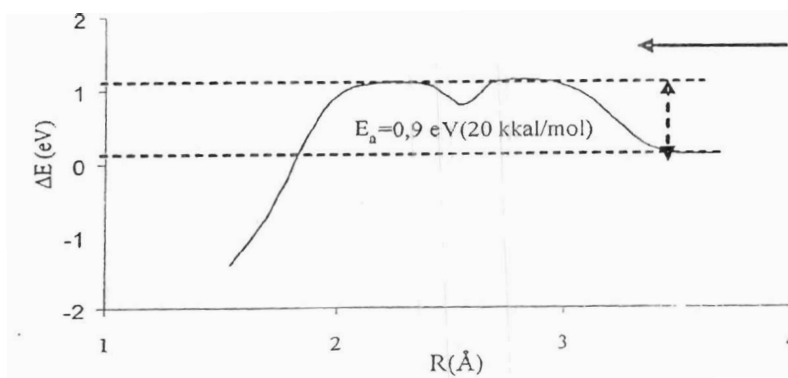




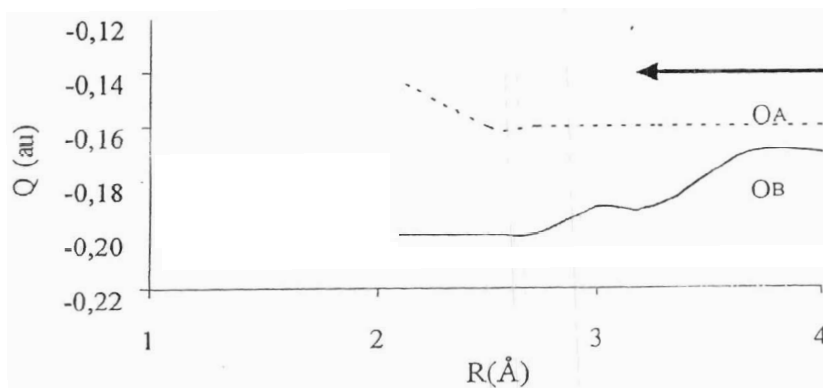
(c)  
 Gambar V.12 (a) Model interaksi Lys dan FMNHOO<sup>-</sup>, (b) Kurva perbedaan energi potensial dan (c) muatan total untuk reaksi pengikatan Lys sesuai pers. V.23 terhadap jarak molekul R Tanda panah pada gambar menunjukkan arah pergerakan molekul Lys-H<sup>+</sup> menuju atom O<sub>B</sub> pada FMNHOO<sup>-</sup>.



(a)

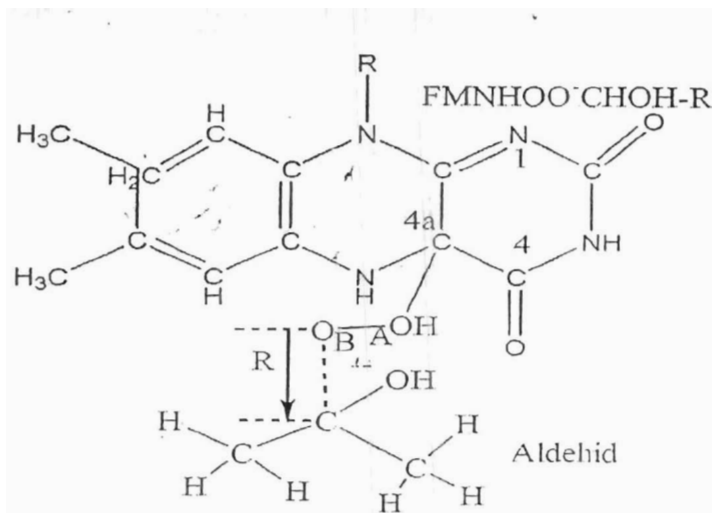


(b)

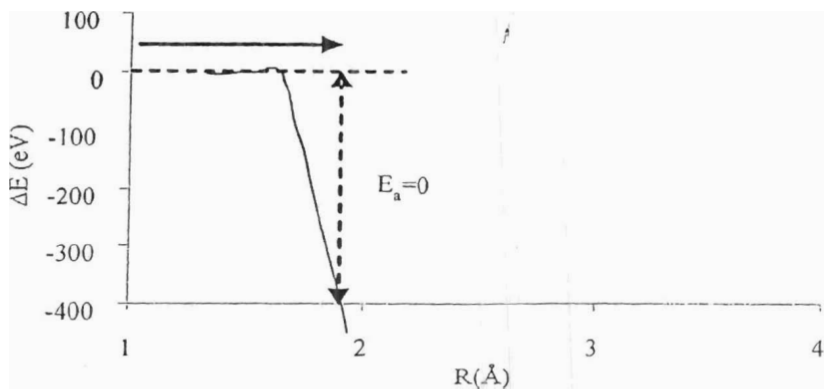


(c)

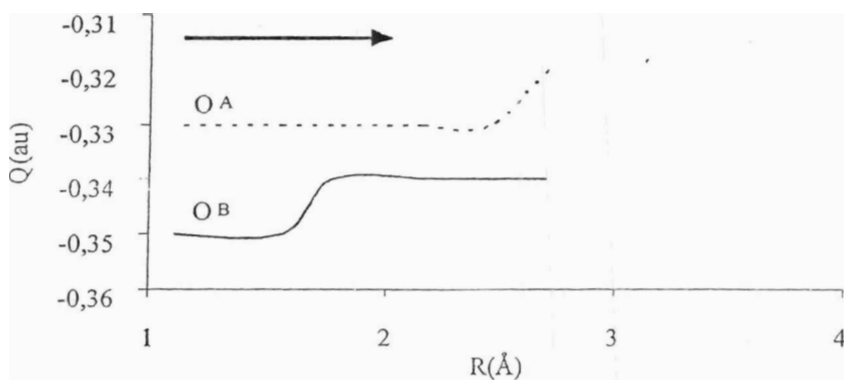
Gambar V.13(a) Model interaksi aldehyd dan FMNHOOH, (b) kurva perbedaan energi potensial dan (c) muatan total untuk reaksi penambahan aldehyd sesuai pers. V.24 terhadap jarak molekul R. Tanda panah pada gambar menunjukkan arah pergerakan molekul Aldehyd menuju atom  $O_B$  pada FMNHOOH.



(a)



(b)



(c)

Gambar V.14(a) Model interaksi RCOOH dan FMNHOO-CHOH-R, (b) Kurva perbedaan energi potensial dan (c) muatan total akibat pelepasan RCOOH dari FMNHOO-CHOH-R sesuai pers. V.25 sebagai fungsi jarak R. Tanda panah pada gambar menunjukkan arah pergerakan molekul RCOOH menjauhi sisi  $O_A$  pada FMNHOO-CHOH-R.

Gambar V.10 memperlihatkan bahwa sebuah proton ditransfer dari sisi  $N_1$  dari  $FMNH_2$  ke atom terminal O dari  $-CNH_2O^-$  dari rantai sisi Asn pada jarak  $R=2,4 \text{ \AA}$  {Gambar V.10(b)}. Transfer proton ini ditandai pengurangan muatan total secara drastis pada atom  $N_1$  pada jarak  $R = 2,4 \text{ \AA}$  dan pada saat yang sama terjadi perpindahan proton dari sisi  $N_1$  dari  $FMNH_2$  ke Asn {Gambar V.10(c)}. Perpindahan proton ke Asn hanya pada sisi  $N_1$  dari  $FMNH_2$  karena muatan total pada sisi lain dari  $FMNH_2$  seperti pada sisi  $C_{4a}$  adalah konstan. Energi barrier dari reaksi ini adalah  $0,17 \text{ eV}$  sedangkan molekul baru yang dihasilkan adalah  $FMNH^-$

Gambar V.11 memperlihatkan bahwa perbedaan energi potensial dan muatan total pada sisi  $N_5$  dan  $C_{4a}$   $FMNH^-$  sebagai fungsi dari  $R$  dimana  $R$  adalah jarak sisi  $C_{4a}$  dari  $FMNH^-$  dengan atom  $O_A$  dari  $O_2$ . Perbedaan energi potensial dihitung mulai pada jarak  $R = 4 \text{ \AA}$  dimana arah awal ikatan O-O diasumsikan paralel dengan bidang  $FMNH^-$ . Besarnya energi barrier akibat reaksi ini adalah  $0,8 \text{ eV}$  pada  $R = 2 \text{ \AA}$  {Gambar V.11(b)}. Proton berpindah dari atom  $O_A$  pada  $O_2$  menuju sisi  $C_{4a}$ . Perpindahan proton ditandai oleh penambahan muatan total di  $C_{4a}$  dan pengurangan muatan di  $O_A$  pada jarak  $R = 2 \text{ \AA}$ . Penambahan  $O_2$  menyebabkan sisi  $N_5$  pada  $FMNH^-$  ikut menyumbang muatan kepada sisi  $C_{4a}$  {Gambar V.11(c)}. Akibat penambahan  $O_2$  ini pada  $FMNH^-$  maka dihasilkan molekul baru  $FMNHOO^-$ .

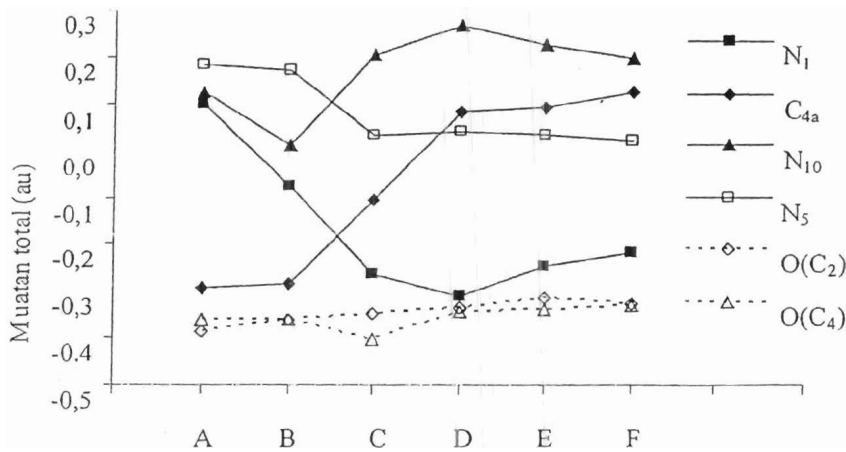
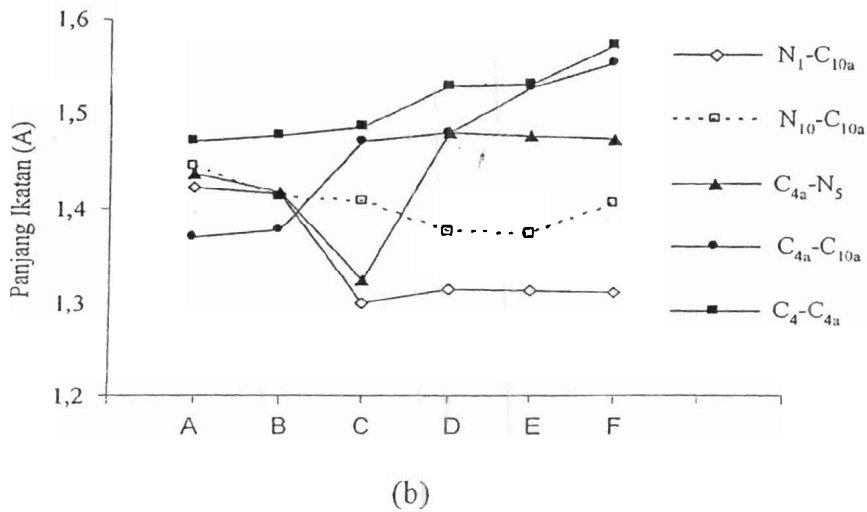
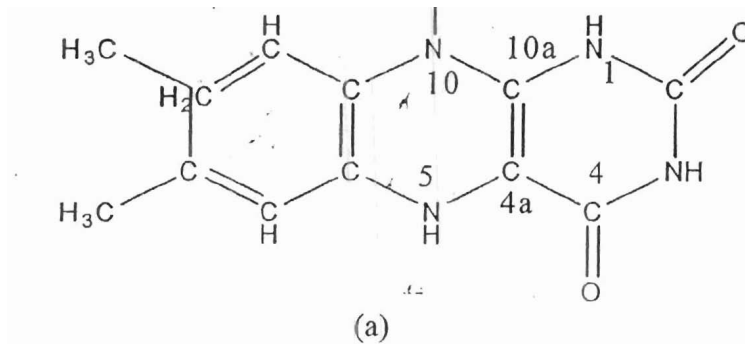
Gambar V.12 memperlihatkan penurunan energi potensial secara drastis terjadi pada jarak  $R = 3 \text{ \AA}$  ketika residu LysH mendekati atom  $O_B$ . Tidak ada energi barrier untuk reaksi Lys sehingga reaksi bersifat spontan {Gambar V.12(b)}. Akibat reaksi ini adalah sebuah proton secara spontan bergerak dari LysH ke atom  $O_B$  yang terikat pada  $FMNOO^-$  pada  $R = 3 \text{ \AA}$ . Pada sisi lain muatan total di  $O_B$  bertambah {Gambar V.12(c)}. Akibat reaksi ini terbentuk molekul baru  $FMNHOOH$ .

Gambar V.13 memperlihatkan pengikatan atom terminal C dari RCOH dengan atom  $O_B$  dari molekul FMNHOOH dengan jarak R. Pada saat RCOH mendekati  $O_B$  pada jarak  $R=3,6 \text{ \AA}$  maka kurva energi potensial bertambah secara cepat dan maksimum pada energi potensial 0,9 eV {Gambar V.13(b)}. Penambahan RCOH pada molekul FMNHOOH menyebabkan sebuah proton ditransfer dari atom  $O_B$  ke atom  $O_A$  yang ditandai penurunan muatan total di  $O_B$  {Gambar V.13(c)}. Molekul baru yang dihasilkan adalah FMNHOO-CHOH-R.

Gambar V.14 memperlihatkan bahwa pelepasan molekul RCOOH dari FMNHOO-CHOH-R menyebabkan penurunan energi potensial secara drastis pada jarak  $R = 1,7 \text{ \AA}$  {Gambar V.14(b)}. Tidak ada energi barrier yang terjadi akibat reaksi pelepasan ini sehingga reaksi bersifat spontan. Akibat pelepasan molekul RCOOH pada molekul FMNHOO-CHOH-R menyebabkan atom  $O_B$  mendapatkan tambahan sebuah proton pada jarak  $1,7 \text{ \AA}$  dan atom  $O_A$  mendapatkan tambahan sebuah proton pada jarak  $R = 2,6 \text{ \AA}$  {Gambar V.14(c)}. Molekul baru yang dihasilkan adalah FMNHOOH yang diduga sebagai molekul dalam keadaan eksitasi.

Perubahan panjang ikatan dan muatan total dari enam bentuk flavin akibat reaksi sesuai pers. V.21 s.d V.25 diperlihatkan pada Gambar V.15. Berdasarkan Gambar V.15(a) dapat disimpulkan bahwa panjang ikatan dari sisi  $C_4-C_{4a}$  dan  $C_{4a}-C_{10a}$  dari flavin bertambah akibat interaksi kedudukan aktif LBPP dengan substrat-substratnya. Pertambahan panjang ikatan pada kedua sisi ini berhubungan dengan peran sisi  $C_{4a}$  sebagai penerima proton (protonisasi) dari kedudukan aktif Lys melalui molekul  $O_2$ . Sebaliknya terjadi pemendekan panjang ikatan sisi  $N_{10}-C_{10a}$  dan  $N_1-C_{10a}$  yang berhubungan dengan peran sisi  $N_1$  sebagai pemberi proton pada kedudukan aktif Asn. Sedangkan Gambar V.13.(c) memperlihatkan bahwa muatan total pada sisi  $N_1$  dari flavin cenderung berkurang dan muatan total pada sisi  $C_{4a}$  cenderung bertambah selama tahapan reaksi. Muatan total pada sisi yang lain dari flavin seperti  $N_{10}$ ,  $N_5$ ,  $O(C_2)$  dan  $O(C_4)$  cenderung konstan selama reaksi.





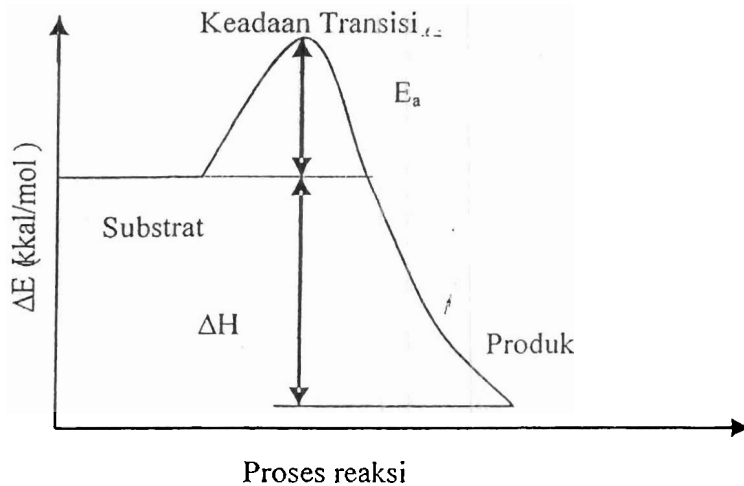
(c)

A:  $FMNH_2$       B:  $FMNH^-$       C:  $FMNHOO^-$   
D:  $FMNHOOH$       E:  $FMNHOO-CHOH-R$       F:  $FMNHOH$

Gambar V.15 (a) Model struktur  $FMNH_2$ , (b) perubahan panjang ikatan dan (c) muatan total dari enam jenis flavin akibat reaksi sesuai pers. V.21 s.d V.25.

## V.6 Profil Perbedaan Energi Potensial pada Reaksi LBPP

Untuk mendapatkan model mekanisme pemancaran cahaya pada LBPP, digunakan model kurva reaksi yang dikembangkan dari Gambar II.5 seperti diperlihatkan pada Gambar V.14



Gambar V.16 Kurva perbedaan energi potensial pada reaksi LBPP.

Suatu reaksi pada Gambar V.16 dapat berlangsung bila molekul-molekul substrat mengalami keadaan aktif dengan energi aktivasi  $E_a$ . Contoh perhitungan energi aktivasi  $E_a$  setiap keadaan intermediat telah dibahas pada Bab V.4. Dalam keadaan demikian ikatan dalam molekul dapat terputus atau bersatu sehingga memungkinkan terbentuknya produk. Keadaan molekul dimana substrat berada dalam keadaan aktif disebut keadaan transisi. Sedangkan energi aktivasi diartikan sebagai jumlah energi (dalam kalori) yang dibutuhkan oleh satu mol zat pada temperatur tertentu untuk membawa semua molekul (dari satu mol zat) ke keadaan aktifnya. Keadaan transisi memiliki energi bebas Gibbs, enthalpi dan energi potensial lebih tinggi dari keadaan yang berdekatan yang terletak pada lintasan tersebut. Berdasarkan Gambar V.16 dapat dibuat profil energi potensial reaksi LBPP dengan terlebih dahulu menghitung enthalpi pembentukan ( $\Delta H_f$ ), substrat dan molekul baru yang terbentuk akibat reaksi sesuai pers. (V.21) s.d (V.25). Secara kuantum, enthalpi pembentukan standar  $\Delta H_f^\circ$  suatu senyawa

diperoleh berdasarkan jumlah semua interaksi yang terjadi dalam molekul yaitu energi elektronik total ( $E_{elek}$ ), energi repulsif inti-inti ( $E_{nuc}$ ), energi yang diperlukan untuk mengionisasi elektron valensi dari atom-atom  $\{E_{isol}(A)\}$  dan panas atomisasi  $\{E_{atom}(A)\}$ . Enthalpi pembentukan standar  $\Delta H_f$  dapat ditulis

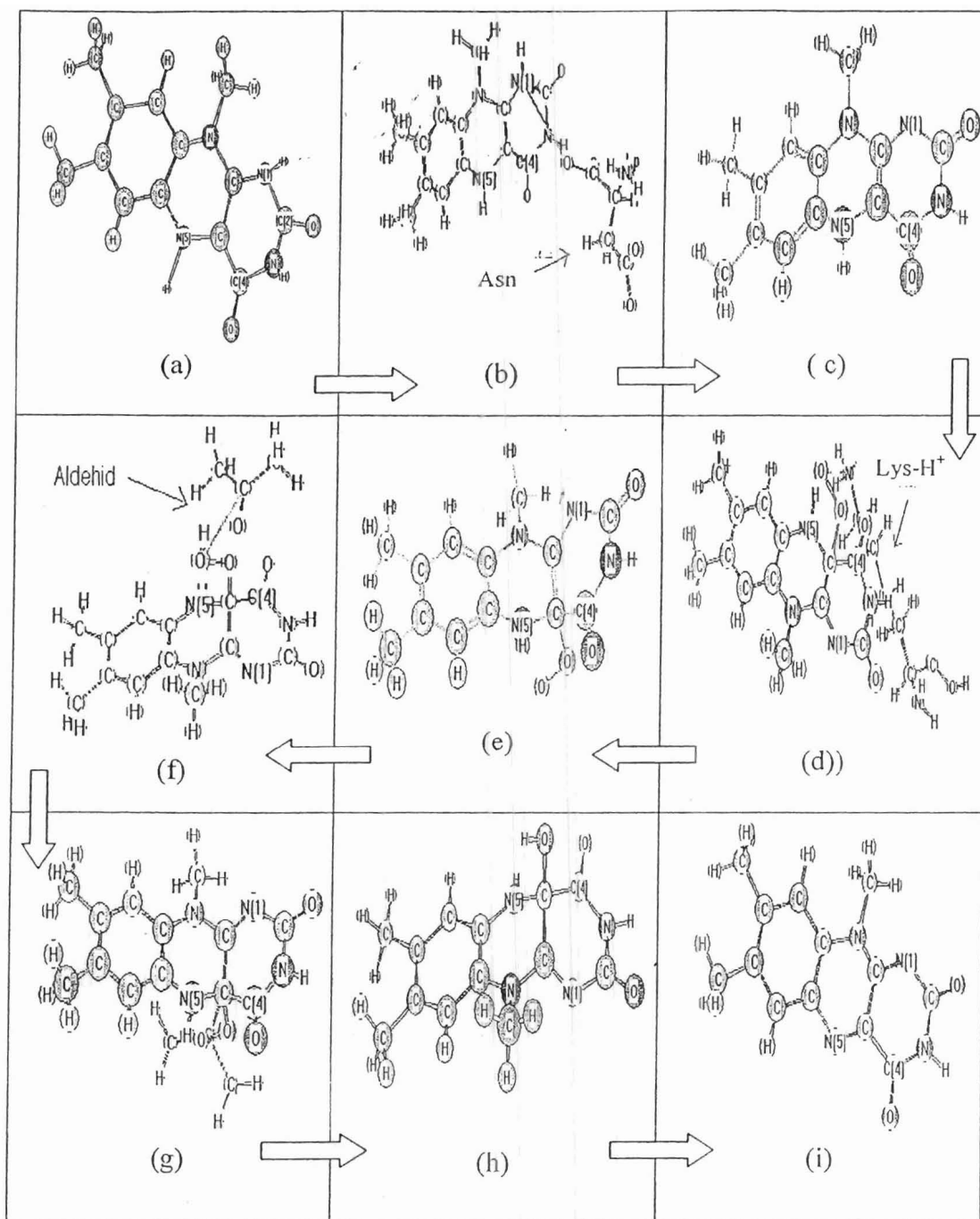
$$\Delta H_f = E_{elec} + E_{nuc} + \sum_A E_{isol}(A) + \sum_A E_{atom}(A) \quad (V.26)$$

dimana A adalah atom ke-a. Perubahan enthalpi dari setiap keadaan intermediat (KI) dan energi barrier dari setiap keadaan transisi (KT) dirangkum pada Gambar V.17. Berdasarkan perubahan enthalpi pembentukan dan energi barrier aktivasi pada Gambar V.17 dapat dihitung energi yang tersimpan dalam setiap keadaan intermediat yang dinyatakan dalam bentuk perubahan enthalpi reaksi  $\Delta H$  sebagai berikut

$$\Delta H = \Delta H_{f(\text{produk})} - \Delta H_{f(\text{reaktan})} \quad (V.27)$$

Selanjutnya jumlah energi pada setiap KI yang digunakan untuk melakukan kerja bioluminisensi dapat dihitung berdasarkan perubahan energi bebas Gibbs  $\Delta G$  sesuai pers. V.3 dimana  $\Delta H$  pada persamaan tersebut dihitung dari pers. V.27.

Diagram energi hasil perhitungan  $\Delta H$  dan  $\Delta G$  setiap KI dapat dilihat pada Gambar V.18.



Gambar V.17 Mekanisme model reaksi LBPP , (a) FMNH<sub>2</sub> ( $\Delta H_f = -82,28$  kkal/mol), (b) KT-1 ( $E_a = 3,9$  kkal/mol), (c) KI-1 ( $\Delta H_f = -84,86$  kkal/mol), (d) KT-2 ( $E_a = 18,5$  kkal/mol), (e) KI-2 ( $\Delta H_f = -87,120$  kkal/mol), (f) KT-3 ( $E_a = 20$  kkal/mol), (g) KI-3 ( $\Delta H_f = -97,50$  kkal/mol), (h) KE atau IV\* ( $E_a = 0$  kkal/mol,  $\Delta H_f = -97,5$  kkal/mol) dan (i) FMN ( $\Delta H_f = -17,28$  kkal/mol).

# PENGARUH LOGAM BERAT TERHADAP INHIBISI DAN AKTIVASI INTENSITAS BIOLUMINISANSI DARI BAKTERI

## *Photobacterium phosphoreum*

*Ratnawulan,*

Jurusan Fisika FMIPA Universitas Negeri Padang

Jl. Prof Dr. Hamka Air Tawar Padang, 25131, Telp (0751)51260, 57720

Pes. 273, Fax (0751) 55628, e-mail: ratna\_unp@yahoo.com

..

Telah dilakukan analisis tentang pengaruh beberapa logam berat terhadap inhibisi dan aktivasi intensitas bioluminisensi dari bakteri *Photobacterium phosphoreum*. Hasil penelitian menemukan bahwa inhibisi dan aktivasi intensitas bioluminisensi dipengaruhi oleh berat molekul dari logam berat. Dari hasil tersebut dapat dijelaskan pengaruh kation pada proses transfer elektron dan sistem bioluminisensi. Kation dapat berpartisipasi dalam distribusi kembali kerapatan elektron dalam reaksi kimia dan dalam pembentukan keadaan eksitasi elektron. Pola ini menjelaskan bahwa aktivasi bioluminesensi diobservasi dalam kehadiran logam berat dengan nilai  $\Delta G^0$  (e) yang lebih tinggi, sedangkan inhibisi bioluminisensi diobservasi dalam kehadiran logam berat  $\Delta G^0$  (e) yang lebih rendah

*Kata kunci : Parameter fisis bioluminisensi, inhibisi, aktivasi, logam berat, berat molekul*

### 1. Pendahuluan

Cumi-cumi diperairan Indonesia diketahui bisa memancarkan cahaya yang membantu cumi-cumi mencari makanan di kegelapan air, sekaligus menjadi alat penyamaran dari hewan pemangsa. Pringgenies (2003) menyimpulkan bahwa cahaya yang dipancarkan oleh cumi disebabkan adanya hubungan simbiosis antara cumi-cumi jenis *Laligo duvaucelli* dengan bakteri *Photobacterium phosphoreum* yang hidup di dalamnya.

Fenomena bioluminisensi pada bakteri *Photobacterium phosphoreum* sangat menarik untuk dikaji karena merupakan contoh nanofabrikasi fotonik alamiah yang akan menjadi inspirasi untuk penelitian peralatan optik dan spektroskopik dimasa mendatang. Disamping itu, sistem bioluminisensi dari bakteri luminesen telah banyak digunakan sebagai alat uji untuk monitoring konsentrasi racun di alam. Kratasyuk, *et.al*, (2004) mengungkapkan bahwa alat uji bioluminisensi yang memakai enzim merupakan pendekatan baru dalam monitoring lingkungan. Dengan ketersediaan bahan baku yang

sangat melimpah di perairan Indonesia, maka dimungkinkan untuk melihat perubahan perilaku parameter fisis bioluminisensi bakteri akibat diberi logam berat.

Proses pemancaran cahaya dari bakteri *Photobacterium Phosphorium* melibatkan enzim luciferase yang mengkatalis tiga substrat yaitu flavin mononukleotida tereduksi (FMNH<sub>2</sub>), molekul oksigen (O<sub>2</sub>) dan aldehide rantai panjang (RCOH). Reaksi tersebut membebaskan flavin (FMN), asam fatty rantai panjang (RCOOH), molekul air (H<sub>2</sub>O) sambil memancarkan cahaya tampak ( $h\nu$ ) (Hasting, 1998). Pada keadaan tereksitasi elektron tidak stabil dan akan kembali ke tingkat dasarnya sambil melepaskan foton dalam bentuk cahaya yang berwarna biru. Energi yang dihasilkan dari reaksi ini lebih dari cukup untuk memberikan 60 kkal/mol yang diperlukan untuk pemancaran cahaya dengan panjang gelombang 490nm (Meigen, dkk., 1980).

Disisi lain bakteri menghasilkan cahaya sebagai produk dari respirasi selnya. Respirasi dalam sel tersebut sangat fundamental terhadap metabolisme sel dan merupakan proses hidup. Penurunan aktifitas sel (akibat toksin) menghasilkan kecepatan pengurangan respirasi dan berhubungan dengan kecepatan luminesensi. Bakteri memancarkan cahaya pada kondisi optimumnya sebagai hasil dari fungsi normal dari proses metabolisme yang terjadi dalam bakteri. Disamping itu bakteri ini bersifat aerob karena memerlukan oksigen dalam reaksi bioluminesen dan akan memancarkan cahaya bila kerapatannya  $4,6 \times 10^9$  CFU/ml, apabila kerapatannya kurang dari jumlah tersebut maka bakteri tidak akan memancarkan cahaya (Pringgenis, 2001).

Secara energetika, pemancaran cahaya dari bakteri luminesensi terjadi ketika sebagian besar dari reaksi kimia yang eksoterm ( $\Delta G$ ) diubah kedalam energi eksitasi elektronik (\*) dari produk reaksi dan kemudian memancarkan cahaya dengan energi ( $h\nu$ ). Untuk ringkasnya prosesnya dapat dirumuskan sebagai berikut :

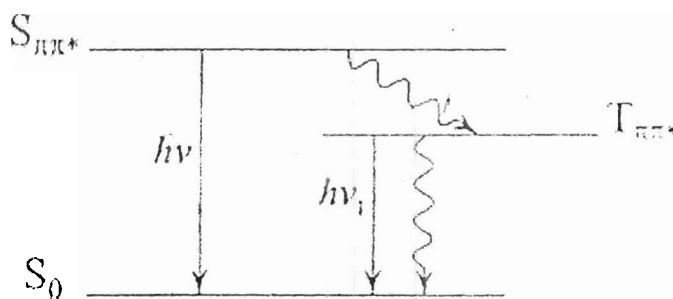


Langkah  $\Delta G \rightarrow *$  disebut dengan langkah kemeieksitasi dan langkah  $* \rightarrow h\nu$  disebut dengan langkah luminesensi. Persyaratan lain adalah  $\Delta G$  menghasilkan energi yang cukup untuk membentuk keadaan eksitasi (Garcia, dkk., 2001) dan persyaratan energi dapat ditentukan dalam bentuk

$$\Delta G \geq hc/\lambda_{ex} \quad (2)$$

dimana  $\lambda_{ex}$  adalah batas panjang gelombang untuk mengeksitasi spesies luminisensi.

Mekanisme bioluminisensi merupakan kombinasi kompleks dari teori biokimia-fisika, yang menyebabkan terjadinya transfer energi dan elektron (muatan) didalam bakteri. Pengaruh berbagai jenis senyawa logam berat terhadap inhibisi dan aktivasi intensitas bioluminisensi dikarakterisasi dengan meninjau crossing intersistem ( $T_1 \rightarrow S_1$ ) yang merupakan proses yang mungkin terjadi yang mempunyai pengaruh pada intensitas bioluminisensi, quantum yield fluoresensi seperti diperlihatkan pada Gambar 1



Gambar 1. Diagram Jablonsky dari sistem bioluminisensi (Gerasimova and Kudryasheva, 2002)

Nilai intensitas maksimum bioluminisensi dalam kehadiran senyawa logam berat dengan konsentrasi molar tertentu ( $I_{max}$ ) akan dibandingkan dengan nilai intensitas bioluminisensi tanpa senyawa logam berat ( $I_{0, max}$ ). Perbandingan ( $I_{max}/I_{0, max}$ ) kemudian ditulis ulang sebagai ( $I/I_0$ ). Pengaruh kehadiran senyawa logam berat pada sistem bioluminisensi bakteri akan dianalisis dengan parameter-parameter yang didefinisikan berikut ini:  $(I/I_0)_{max}$  adalah perbandingan maksimum dari nilai intensitas bioluminisensi dengan dan tanpa kehadiran senyawa logam berat.

## 2. Metode

Bahan utama yang digunakan pada penelitian ini ialah Luciferase dari bakteri *Photobacterium phosphoreum* (LBPP) beserta substrat-substratnya (FMNH,  $O_2$  dan RCOH) dan senyawa logam berat (kobalt, tembaga, timah, merkuri, dan mangan). Bahan

dasar LBPP di peroleh dalam penelitian sebelumnya (Ratnawulan, dkk, 2005) dan bahan dasar substrat dan enyawa logam berat dibeli dari SIGMA.

Untuk mencapai tujuan penelitian ini, pola pendekatan ilmiah yang digunakan adalah eksperimen. Pendekatan eksperimen bertujuan mengukur perubahan ntensitas bioluminisensi dan *quantum yield* setelah bakteri *Photobacterium phosphoreum* setelah diberi logam berat dengan berat molekul, dan jumlah kation yang berbeda-beda. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan Spèktrofotometer Fluoresensi Model F 2000.

LBPP dibagi kedalam 31 buah bejana gelas kecil ukuran 5 ml dengan perincian 1 tabung diambil sebagai kontrol dan diukur intensitas cahayanya dengan spektrofotometer melalui injeksi cepat dari 1 ml dari  $5 \times 10^{-5}$  M FMNH<sub>2</sub> pada 1,2 ml dari campuran reaksi mengandung luciferase, dodekanal, 0,2 % BSA dan oksigen dalam buffer fosfat 0,02 M pada pH 7. Aldehid ditambahkan dalam jumlah optimal (sekitar 100 µL) . Satuan berkenaan aktivitas enzim yang didapatkan dari pengukuran intensitas cahaya ini dinyatakan dalam quanta sec<sup>-1</sup> ml<sup>-1</sup> enzim, diukur sebagai intensitas maksimum awal pada saat pencampuran pada suhu 25<sup>0</sup>C. Sedangkan 30 tabung yang lain dibagi menjadi 5 bagian dan dilabel dengan cobalt (yang terdiri dari 6 tabung dengan konsentrasi cobalt yang berbeda), tembaga (yang terdiri dari 6 tabung dengan konsentrasi tembaga yang berbeda-beda), timah (yang terdiri dari 6 tabung dengan konsentrasi timah yang berbeda-beda), merkuri (yang terdiri dari 6 tabung dengan konsentrasi merkuri yang berbeda-beda) dan mangan (yang terdiri dari 6 tabung dengan konsentrasi mangan yang berbeda-beda). Pembacaan intensitas dengan spektrofotometer untuk semua sampel dilakukan setelah campuran 1,2 ml dari campuran reaksi mengandung luciferase, dodekanal, 0,2 % BSA, dan oksigen dalam buffer fosfat 0,02 M pada pH 7, aldehid 100 µL dan 20 µl larutan senyawa logam berat diinjeksi dengan 1 ml dari  $5 \times 10^{-5}$  M FMNH<sub>2</sub> pada untuk 15 menit. Hasil pengumpulan data akan mendapatkan nilai intensitas bioluminsensi dan *quantum yield* terhadap konsentrasi logam berat.

Nilai parameter inhibisi intensitas bioluminisensi  $K_i'$  dapat dihitung dengan menggunakan persamaan kurva peluruhan berikut :

$$\frac{I}{I_0} = A + \exp(-K_i'.C) \quad (3)$$



dimana C adalah konsentrasi senyawa logam berat dan A adalah konstanta normalisasi.

Sedangkan nilai parameter aktivasi intensitas bioluminisensi  $K_a^I$  dihitung dengan memakai persamaan berikut

$$\frac{I}{I_0} = 1 + \exp(-K_a^I \cdot C)^\alpha \quad (4)$$

dimana  $\alpha$  adalah *power indeks*.

*Quantum yield* bioluminisensi Q didefinisikan sebagai daerah dibawah kurva peluruhan (intensitas terhadap waktu). *Quantum yield* dalam kehadiran senyawa logam berat dengan konsentrasi tertentu ditulis (Q) akan dibandingkan dengan nilai *quantum yield* tanpa senyawa logam berat ( $Q_0$ ). Sehingga nilai parameter inhibisi yield cahaya bioluminisensi  $K_i^Q$  dapat dihitung dengan memakai persamaan berikut:

$$\frac{Q}{Q_0} = B + \exp(-K_i^Q \cdot C) \quad (5)$$

dimana C adalah konsentrasi senyawa logam berat dan B adalah konstanta normalisasi.

Sedangkan nilai parameter aktivasi yield cahaya bioluminisensi  $K_a^Q$  dihitung menggunakan pertambahan awal dari kurva peluruhan dengan memakai persamaan berikut:

$$\frac{Q}{Q_0} = 1 + \exp(-K_a^Q \cdot C)^\beta \quad (6)$$

dimana  $\beta$  adalah *power indeks*. Nilai  $K_i^I, K_a^I, K_{ai}^Q, K_a^Q, \alpha, \beta$  dihitung menggunakan pemodelan kedepan atau inversi dengan bantuan paket program MATLAB versi 7.0.1.24704 (Release 14).

Pengaruh dari kation senyawa logam berat pada distribusi kerapatan elektron dalam sistem bioluminisensi dinyatakan dengan energi bebas Gibbs pengambilan elektron dari kation logam berat  $\Delta G^0$  (e)

$$\Delta G^0(e) = \Delta G^{(n-1)+} - \Delta G^{n+} \quad (7)$$

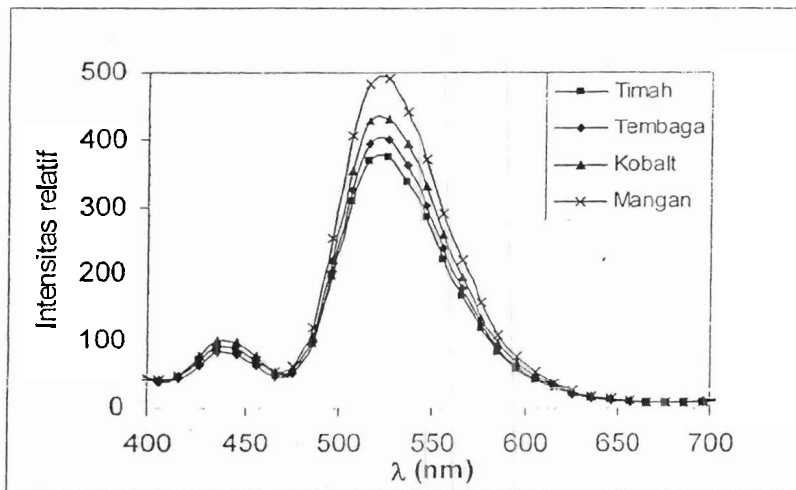
dimana  $\Delta G^{(n-1)+}$  adalah energi bebas standar pembentukan kation yang bermuatan (n)- dan  $\Delta G^{n+}$  adalah energi bebas standar pembentukan kation yang bermuatan (n-lyang dihitung berdasarkan energi-energi pembentukan standar kation-kation dari atom-atom

bebas dalam vakum dan energi-energi hidrasi standar dari kation-kation logam berat (Kudryasheva, dkk., 1994 & 2004).

Energi bebas Gibbs ( $\Delta G$ ) akan ditentukan berdasarkan nilai berat molekul dan berat anion/kation dari senyawa logam berat. Nilai energi elektron yang diambil dari kation dari setiap senyawa logam berat  $\Delta G^0(e)$  dihitung menurut pers. (7). Koefisien inhibisi dan aktivasi dari sistem bioluminisensi  $K'_i$ ,  $K'_a$ ,  $K''_i$ , dan  $K''_a$  Kemudian dibandingkan dengan energi bebas Gibbs pengambilan elektron dari kation logam berat  $\Delta G^0(e)$ . Korelasi yang dihasilkan akan menjelaskan pengaruh kation-kation setiap logam berat pada proses transfer elektron dan pembentukan keadaan eksitasi dalam sistem bioluminisensi.

### 3. Hasil

Hasil pengukuran spektrum pemancaran cahaya pada LBPP setelah mengikat substrat pada berbagai jenis logam berat dapat dilihat pada Gambar 2.

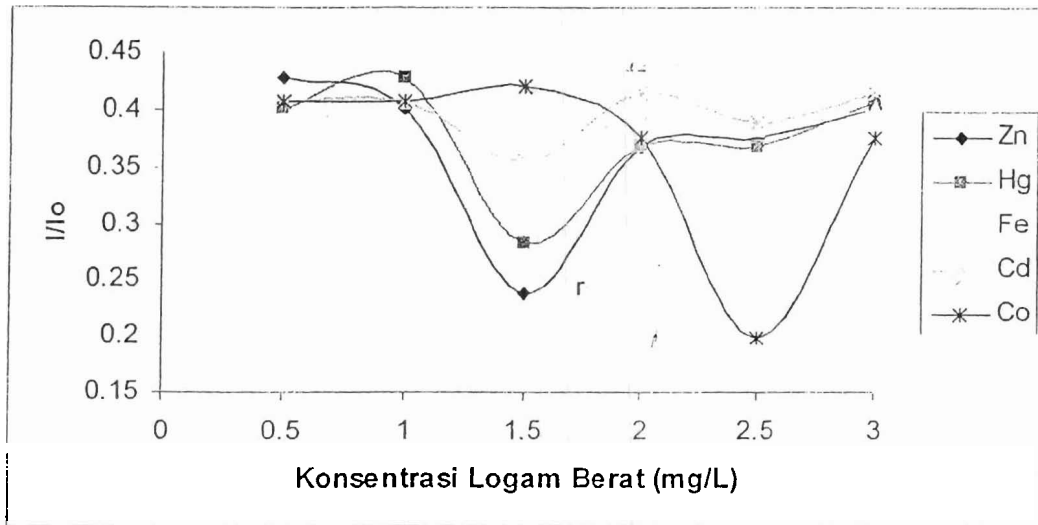


**Gambar 2.** Spektrum pemancaran cahaya dari LBPP setelah mengikat substrat pada berbagai jenis logam berat. Intensitas maksimum tetap terjadi pada panjang gelombang 526 nm untuk setiap jenis logam berat.

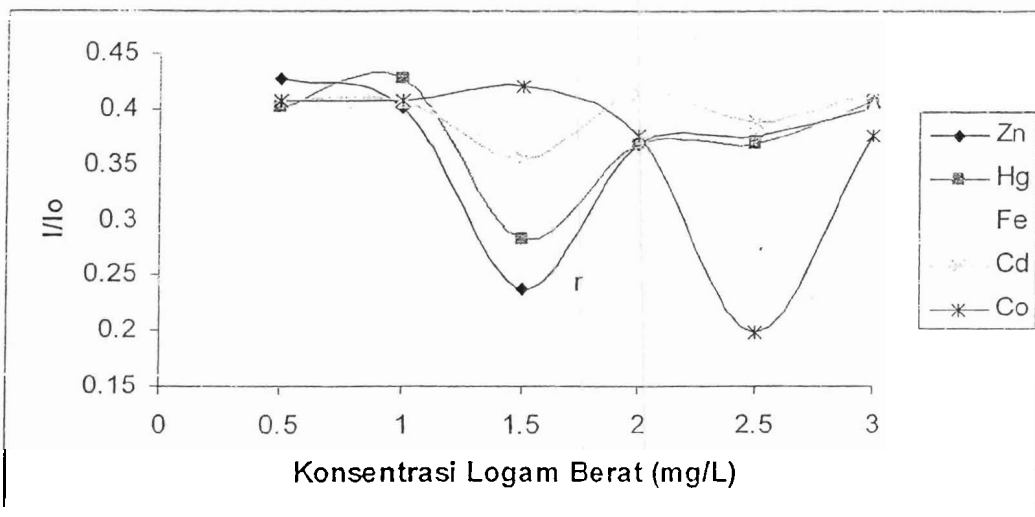
Gambar 2 memperlihatkan bahwa intensitas maksimum tetap terjadi pada panjang gelombang 526 nm untuk setiap jenis logam berat konsentrasi masing-masing 3 mg/l. Berdasarkan Gambar 2 terlihat bahwa mangan mempunyai pengaruh yang lebih kecil

terhadap intensitas pemancaran cahaya daripada logam berat-logam berat lainnya. Kehadiran timah, tembaga, kobalt dan mangan menyebabkan intensitas cahaya turun sampai 51,7 %, 48,1 %, 44,2 % dan 36,4 % dari intensitas semula, secara berturut-turut.

Hasil aktivitas dan quantum yield LBPP setelah diberi berbagai jenis logam berat dengan konsentrasi yang berbeda-beda ditunjukkan oleh Gambar 3 (a) dan (b).



Gambar 3(a). Plot Intensitas Bioluminisensi ( $I/I_0$ ) terhadap konsentrasi logam berat.



Gambar 3(b). Plot kuantum yield terhadap konsentrasi logam berat

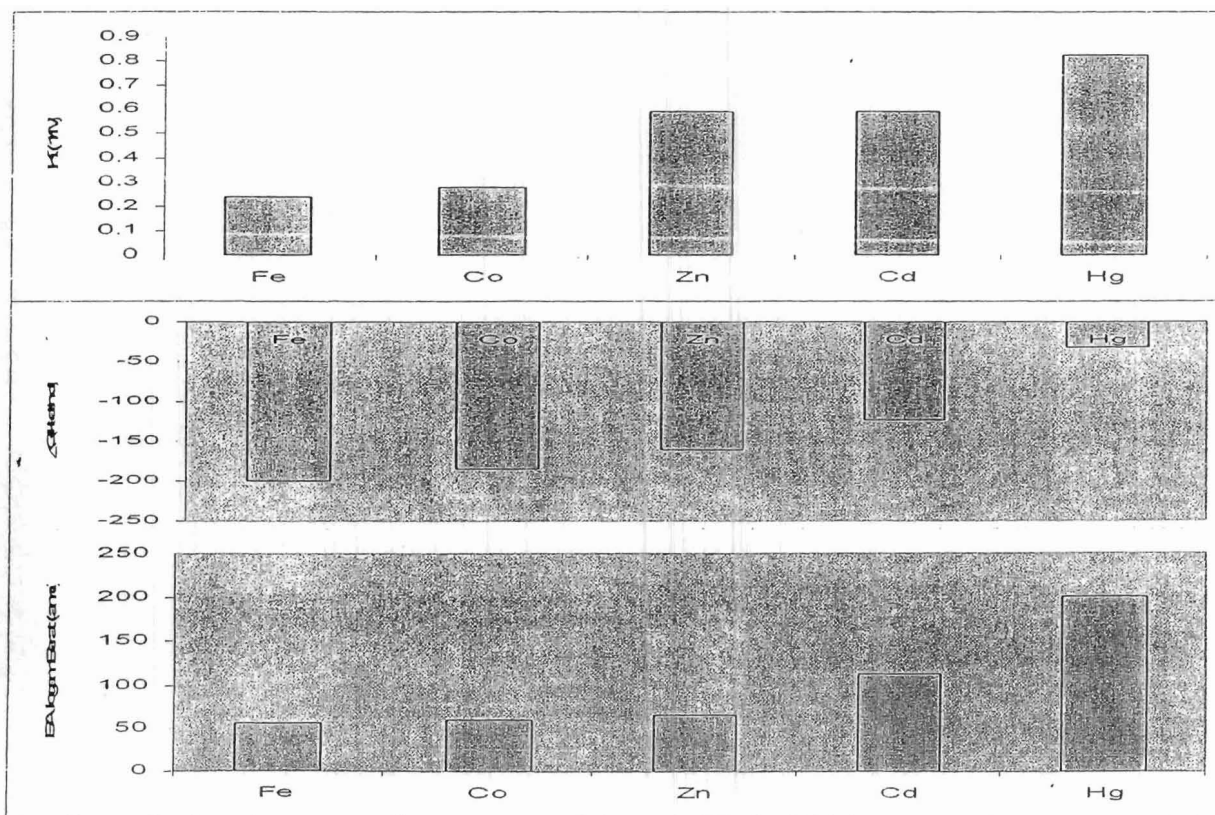
Kecendrungan grafik intensitas bioluminisensi dan quantum yield terhadap intensitas luminisensi LBPP akibat adanya logam berat menunjukkan pola yang sama. Pada konsentrasi 2,5 mg/L aktivitas logam berat Cobalt (Co) menunjukkan penurunan yang lebih besar dibandingkan dengan logam berat yang lain.

Dari Gambar 3 kemudian dilakukan perhitungan untuk melihat koefisien inhibisi dan aktivasi dari LBPP akibat diberi logam berat. Perhitungan dilakukan berdasarkan hubungan nilai intensitas maksimum bioluminisensi dalam kehadiran senyawa logam berat dengan konsentrasi molar tertentu ( $I_{max}$ ) dibandingkan dengan nilai intensitas bioluminisensi tanpa senyawa logam berat ( $I_{0, max}$ ). Hasil Perhitungan parameter inhibisi, aktivasi dan energi bebas Gibbs ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Parameter inhibisi, aktivasi dan energi bebas Gibbs akibat diberi logam berat

Logam Berat	FeSO4 7H2O	CoSO4	ZnSo4 7H2O	CdSO4 8H2O	HgCl2
BM/BA	278/55.85	155/58.93	287.5/65.38	769.5/112.4	271.5/200.6
C (mg/L)	0.5 - 3	0.5 - 3	0.5 - 3	0.5 - 3	0.5 - 3
$\Delta G$ kkal/mol	-200.5	-185.20	-160.907	-123.21	-32.65
(I/I <sub>0</sub> )min	0.362	0.199	0.237	0.355	0.283
Ki	0.239	0.278	0.591	0.5911	0.827
Ka	0.038	0.038	0.033	0.0038	0.003

Karakteristik Inhibisi dan Aktivasi dari logam berat pada sistem Bioluminisensi Bakteri *Photobacterium phosphoreum* diperlihatkan pada Gambar 4 berikut.



Gambar 4. Korelasi koefisien inhibisi dengan energi bebas Gibbs dan berat atom logam Berat

Pola pada Gambar 4 dapat digunakan untuk menjelaskan pengaruh kation pada proses **transfer elektron** dan sistem bioluminisensi. Kation dapat berpartisipasi dalam distribusi kembali kerapatan elektron dalam reaksi kimia dan dalam pembentukan keadaan eksitasi elektron. Pola ini menjelaskan bahwa aktivasi bioluminesensi diobservasi dalam kehadiran logam berat dengan nilai  $\Delta G^0$  (e) yang lebih tinggi, yang memperlihatkan kemungkinan paling rendah dari penggantian elektron dengan kation. Inhibisi bioluminisensi diobservasi dalam kehadiran logam berat  $\Delta G^0$  (e) yang lebih rendah.

#### 4. Kesimpulan

Hasil pemberian beberapa jenis logam berat pada sistem bioluminisensi dari bakteri menyimpulkan bahwa kation dari logam berat berpartisipasi dalam distribusi kembali kerapatan elektron dalam reaksi kimia dan dalam pembentukan keadaan eksitasi elektron. Aktivasi bioluminesensi diobservasi dalam kehadiran logam berat dengan nilai  $\Delta G^0$  (e) yang lebih tinggi, yang memperlihatkan kemungkinan paling rendah dari penggantian elektron dengan kation. Inhibisi bioluminisensi diobservasi dalam kehadiran logam berat  $\Delta G^0$  (e) yang lebih rendah.

#### Daftar Pustaka

- Garcia, Campana., Baeyens, AM., Zhang, X., Ales, F., and Gamiz, F., (2001), Unfamiliar though exciting analytical detection in flowing streams: chemiluminescence, *Ars Pharmaceutica*, Vol. 42(1), p.81-107
- Hasting, J.W., Bioluminescence, 1998, In: *Cell Physiology*, 2nd Edition, Academic Press, New York, 984-1000.
- Kratasyuk., V.A, Asimbekova., E.N, and Vetrova., E.V, (2004), Enzyme-based biosensor based on bacterial bioluminescence for environmental monitoring, 13 th International Symposium on Bioluminescence & Chemiluminescence Symposium Abstract.

- Kudryasheva N.S., Shalayeva E.V., Zadorochnaya E.N., Stom D.J., Kratasyuk V.A., and Balayan A.E.,(1994), Patterns of bacterial bioluminescence inhibition in vitro by quinones and phenols-component of sewage, *Biofizika* Vol. 39, p.455-464.
- Kudryasheva N.S.,Nemtseva, E.V., and Kirillova, T.N., 2004, Exogenous compounds in studying the mechanisms of electron-excited state formation in bioluminescence, *Biopolymers*, Vol.74, p.100-104.
- Meighen, E.A., dan Bartlet, I. (1980) : Complementation of Subunits from Different Bacterial Luciferases ; Evidence for The Role of The  $\beta$  Subunit in The Bioluminescent Mechanism, *J.Biol.Chem*, **255**, 11181 -11187.
- Pringgenies, D., Sastrodiharjo, S., Nganro, N.R., dan Aryantha, I.N., (2001), Bacteria symbiosis in luminous organ of the squid *Loligo duvaucel* and cuttlefish *Sepia esculenta*, Phuket Marine Biology Centre (Thailand). Spec. Publ. Vol. 22. No.11, p.145-146
- Ratnawulan, Pringgenis,D., dan Arif, I. (2005) : Isolasi dan Identifikasi Bahan Aktif Penyebab Pemancaran cahaya Pada Bakteri *Photobacterium phosphoreum* yang di isolasi dari Cumi laut Indonesia, *J. Makara Seri Sains*, Vol. 9(1), FMIPA Universitas Indonesia.

# Formation of Excitation Condition at *Photobacterium phosphoreum* That Isolated From The Indonesian Marine

*Ratnawulan<sup>\*1</sup>, Idam Arif<sup>2</sup> and Sukirno<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Physics Department, Padang State University

<sup>2</sup> Physics Department, Bandung Institute of Technology

\* Corresponding author. Ratnawulan ; Tel: (022)2512672; Fax: (022)2506452  
E-mail address: ratna\_unp@yahoo.com

Deleted: Submitted to  
Photochemistry and Photobiology  
2009  
(Research Note)

---

\* Corresponding author E-mail : [ratna\\_unp@yahoo.com](mailto:ratna_unp@yahoo.com) (RATNAWULAN)

## ABSTRACT

The activation energy characteristics of each reaction step in the luciferase-catalyzed luminescence of *Photobacterium phosphoreum* bacteria were examined using the MNDO-PM3 methods. The bioluminescence reaction is divided into four intermediates, i.e. intermediate 1, 2, 3 and 4. It shows that the deprotonation at N<sub>1</sub> site of FMNH<sub>2</sub> by Ap active site is experiencing an activation energy as much as 67 kcal/mole to form intermediate state (IS)-1. The IS-1 reaction with O<sub>2</sub> is experiencing an activation energy as much as 18.5 kcal/mole to form IS-2. The IS-2 reaction with RCOH is experiencing an activation energy as much as 20 kcal/mole to form IS-3. RCOOH molecule is then released from IS-3 to form IS-4 which is an excitation condition (IS-4\*). The change of the Gibbs free energy for the excitation condition is 59.22 kcal/mole. This condition coincides closely with the result obtained from the measurement of light wavelength that gives the change of Gibbs free energy of about -55.22 kcal/mole.

Deleted: s

Deleted: iz

Deleted: s



## INTRODUCTION

In the sea region of Indonesia, are found squids *Loligo duvaucelli* that could emit light as a result of their symbiosis with bacteria *Photobacterium phosphoreum* which live in their light-organ. The phenomena of this bioluminescence are exceptionally interesting for further assessment since it becomes a remarkable sample of nature photonic nanofabrication. The process of light emission at luminescence bacteria is involving the enzyme, luciferase, and catalyzed three substrates, i.e. reduced flavin mononucleotide (FMNH<sub>2</sub>), oxygen molecule (O<sub>2</sub>), and long chain aldehyde (RCOH). These reactions would release flavin (FMN), long chains fatty acid (RCOOH), water molecule (H<sub>2</sub>O), while at the same time emitting visible light ( $h\nu$ ) (1). The bioluminescence reaction could be divided into four key intermediates, i.e. intermediate 1, 2, 3 and 4. The intermediate 1 is the condition of FMNH<sub>2</sub> substrate bound to luciferase, intermediate 2 is the condition of O<sub>2</sub> substrate addition to intermediate 1, intermediate 3 is the condition of RCOH substrate addition to intermediate 2, and intermediate 4 is the excitation state that would return to the ground state while at the same time it is emitting the visible light.

Former researchers already revealed the activity patterns of each intermediate from other luminescence bacteria (2,3) and the potential-energy profiles for several possible mechanisms involving the O<sub>2</sub> addition to 1,5H<sub>2</sub>-FMN to form the intermediate 2 in the luciferase reactions (4,5,6). However the development of excited state condition fulfilled at the bacteria, still could not be explained yet. According to these facts, it follows that the main objective of this study is to identify the development of excited state condition at *Photobacterium phosphoreum* bacteria isolated from the Indonesian marine squids.

Deleted: it is

Deleted: certain

Deleted: called as

Deleted: s

Deleted: Those

Deleted: ed

Deleted: disintegrate

Deleted: every

Deleted: for

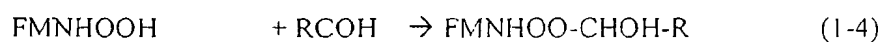
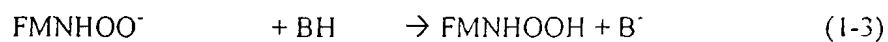
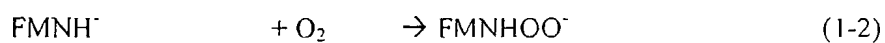
Deleted: But

Deleted: destined

Deleted:

Deleted: computational

This study is based on the delineation of physical characteristics of the light emission by bacteria obtained from the experimental measurements (7) and the physical characteristics of the excitation conditions obtained from computation analysis. In this case, the development of the excitation state conditions of luciferase bacteria *Photobacterium phosphoreum* (LBPP) is studied on the basis of "five-step model" of reactions in which a general acid (A) residue and a general base (B) residue function as proton acceptor and donor, respectively:



Deleted: Asparagine  
Formatted: English (U.S.)  
Deleted: Lysine  
Formatted: English (U.S.)

Based on this study, asparagine (Asn) and lysine (Lys-H) were chosen as representative catalytic residues involved in the protonation (A) and deprotonation processes (B) (8).

## METHODS

Geometrical structure and electronic states of each molecule in Eq. (1-1) to (1-5) were optimized with respect to the total energy of those reaction systems by the MNDO-PM3 method (9). In order to obtain the potential energy curve for each reaction of Eq. (1-1) to (1-5), the total energy of a system consisted of two molecules interacting with each other was minimized using the MNDO-PM3 method by varying all geometrical parameters, at the exception of the molecular distance R. The potential energy curve is shown as the

Formatted: English (U.S.)

Formatted: English (U.S.)

total energy difference  $\Delta E = E(R) - E_0$ , where  $E(R)$  and  $E_0$  are the total energy at distance  $R$  and at reference distance  $4 \text{ \AA}$  respectively. It was found that the obtained potential energy curve is a solution for each reaction path within the framework of our model.

## RESULTS AND DISCUSSION

The dependency of the potential energy ( $\Delta E$ ) and that of net charge ( $Q$ ) at the N(1) site in FMNH<sub>2</sub> at the molecular distance  $R$  for reaction Eq. 1-1 are shown in Fig. 1a and 1b respectively.  $R$  is defined as the distance between the N(1) site in FMNH<sub>2</sub> and the terminal O atom in the -H<sub>2</sub>NO group of the Asn side-chain. Starting the calculation at  $R = 4 \text{ \AA}$ , the conjugated plane of the FMNH<sub>2</sub> ring was within the plane of the -H<sub>2</sub>NO group in Asn. The potential energy  $\Delta E$  is depicted in Fig. 1a relative to the total energy of the system at  $R = 4 \text{ \AA}$  (*i.e.*  $\Delta E = E_T[R] - E_T[4 \text{ \AA}]$ ). The energy barrier ( $E_a$ ) was estimated to be 3.9 kcal/mol at  $R = 2.4 \text{ \AA}$  and a proton is transferred from the N(1) in FMNH<sub>2</sub> to the Asn when the distance between the proton donor and acceptor group reaches  $R = 2.4 \text{ \AA}$ . On the other hand,  $Q_{N1}$  and  $Q_{C4a}$  were almost constant as  $R$  decreased from  $4 \text{ \AA}$ . But  $Q_{N1}$  was drastically reduced upon proton subtraction.

Deleted: On s

Formatted: English (U.S.)

Figure 1>

For the O<sub>2</sub> addition reaction (Eq. 1-2), Fig. 2 shows the  $\Delta E$  and  $Q$  at O<sub>A</sub> sites in O<sub>2</sub> as a function of  $R$ , where  $R$  is the distance from the C<sub>4a</sub> site in FMNH<sub>2</sub> to the O<sub>A</sub> atom in O<sub>2</sub>.  $\Delta E$  is about 18.5 kcal/mol at  $R = 2 \text{ \AA}$  and the addition of O<sub>2</sub> to the C<sub>4a</sub> site in FMNH<sub>2</sub>

occures at 2.2 Å (Fig. 2a). As shown in Fig. 2b, Q remains essentially constant for each of O<sub>A</sub>, N<sub>5</sub> and C<sub>4a</sub>, when R decreases from 4 Å to 2.2 Å, and then Q<sub>O<sub>A</sub></sub> and Q<sub>N<sub>5</sub></sub> decrease and Q<sub>C<sub>4a</sub></sub> increases.

<Figure 2>

The dependency of  $\Delta E$  on the proton addition reaction (Eq. 1-3) and that of Q at O<sub>A</sub> and O<sub>B</sub> sites in FMNH-4aOO<sup>-</sup> on R are shown in Fig.3, where R is defined as the distance between the N atom in the terminal amino group of the Lys-H and the O<sub>B</sub> site in FMNH-4aOO<sup>-</sup>. It is found that a proton can spontaneously move from Lys-H to FMNH-4aOO<sup>-</sup> at R = 3 Å due to the barrierless potential-energy curve (Fig.3a). On the other hand, Q<sub>O<sub>B</sub></sub> drastically increases and reaches the level of Q<sub>O<sub>A</sub></sub> at the point when a proton transfer takes place (Fig. 3b).

Deleted: for  
Formatted: English (U.S.)

<Figure 3>

The dependency of  $\Delta E$  on the aldehyde addition reaction (Eq. 1-4) and that of Q at O<sub>A</sub> and O<sub>B</sub> sites in FMNHOOH on R are shown in Fig.4, where R is defined as the distance between the O<sub>B</sub> site in FMNHOOH to the CH atom in aldehyde. E<sub>a</sub> is about 20 kcal/mol at R=3.6 Å (Fig. 4a) and the addition a proton of O<sub>B</sub> to O<sub>A</sub> atom in FMNHOOH occures at 2.6 Å (Fig.4b).

Deleted: for  
Formatted: English (U.S.)

<Figure 4>

The dependency of  $\Delta E$  on reaction (Eq. 1-5) and that of  $Q$  at  $O_A$  and  $O_B$  sites in FMNHOOCHOHR are shown in Fig. 5. It was found that the RCOOH molecule is spontaneously released from FMNHOOCHOHR at  $R = 1.7 \text{ \AA}$  (Fig. 5a). On the other hand,  $Q_{OB}$  and  $Q_{OA}$  increase and level off at  $1.7 \text{ \AA}$  and  $2.6 \text{ \AA}$  respectively when proton transfer takes place (Fig. 5b).

<Figure 5>

The net charges of five atomic sites for reaction Eq. (1-1) to (1-5) and the change in the length of selected bond in each flavin species for the same reaction are summarized in Fig. 6a and 6b. By deprotonation of N(1) site of FMNH<sub>2</sub>, the net charge of the isoalloxazine part of FMNH<sup>-</sup> decreases to a substantially more negative value (Fig. 6a). Upon successive O<sub>2</sub> addition at the C4a site of FMNH<sup>-</sup> to produce FMNH-4aOO<sup>-</sup>, the net charge of the isoalloxazine part increases to about the original level in the FMNH<sub>2</sub>. This rise in the net charge is essentially a consequence of the increase of net charge at the C4a site (Fig. 6a). On the other hand, bond distances for C4-C4a and C4a-C10a are significantly lengthened, whereas those of N10-C10a and N1-C10a are shortened upon O<sub>2</sub> addition at the C4a site in FMNH<sup>-</sup> (Fig. 6b).

<Figure 6>

According to the five-step model shown in Eq. (1-1) to (1-5), the energy-optimized level of each of these flavin intermediates is depicted in Fig. 7. The computational analysis of

the excitation condition development in *Photobacterium phosphoreum* luminescence has concluded that the deprotonation at N<sub>1</sub> site of FMNH<sub>2</sub> by Asn's active site is experiencing an activation energy as much as 67 kcal/mol to form intermediate state (IS)-1. The IS-1 reaction with O<sub>2</sub> is experiencing an activation energy as much as 18.5 kcal/mol to form IS-2. The IS-2 reaction with RCOH is experiencing an activation energy as much as 20 kcal/mol to form IS-3. RCOOH molecule is then released from IS-3 to form intermediate IV\*, which is called as an excitation state (ES). The change of the Gibbs free energy for the excitation state is 59.22 kcal/mole. This condition coincides closely with the result from the measurement of light wavelength that give the change of Gibbs free energy of about -55,22 kcal/mole (7). Therefore, the proposed mechanism for the development of the excited state becomes the due for the bioluminescence process in *Photobacterium phosphoreum* bacteria.

## ACKNOWLEDGMENTS

Research was developed with the help of financial support from RUT-XII 2004-2005 research project. We thank Prof Waloejo Loeksmanto for useful discussion during the completion of this work.

## REFERENCES

1. Hasting, J.W. (1998) : *Bioluminescence, In: Cell Physiology*, 2nd Edition, Academic Press, New York, 984-1000.

2. Balny, C dan Hasting, J.W. (1975) : Fluorescence and Bioluminescence of Bacterial Luciferase Intermediates, *Biochemistry*, **14**, 4719 - 4723.
3. Macheroux, P., Ghisla, S., dan Hasting, J.W. (1993) : Spectral Detection of an Intermediate Preceding The Excited State in The Bacterial Luciferase Reaction, *Biochemistry*, **32**, 14183 - 14186.
4. Wada, N., Sugimoto, T., Watanabe, H., Tu, S.C and Mager, H.I.X. (1997) : A Theoretical Approach to Elucidate a Mechanism of O<sub>2</sub> Addition to Intermediate I in Bacterial Bioluminescence. In *Bioluminescence and Chemiluminescence*, 58-61.
5. Sugimoto, T., Wada, N., Watanabe, H and Tu, S.C. (1999) : Effect of Deprotonation of Reduced Flavin on Its Reactivity in The Bacterial Luciferase Reaction as Studied by The MNDO-PM3 Method. In *Bioluminescence and Chemiluminescence* (Edited by A. Roda, M. Pazzagli, L. J. Kricka and P. E. Stanley), 429– 432.
6. Wada, N., Sugimoto, T., Watanabe, H and Tu, S.C. (1999) : Computational Analysis of the Oxygen Addition at the C4a Site of Reduced Flavin in the Bacterial Luciferase Bioluminescence Reaction, *Photochemistry and Photobiology*, **70**, 116 – 122.

- #
7. Ratnawulan., Arif,I., Sukirno dan Loeksmanto,W. (2005) : Binding Site Determination for Light Emission in Bacterial Bioluminescence *Photobacterium phosphoreum* That Isolated From The Indonesia Marine Squid, *Proc. Of Asian Physics Symposium (APS)*, 44-48.
  
  8. Arif, Idam and Ratnawulan, (2006) : Determination of Active Site Residues Involved in The Emission of Visible Light From *Photobacterium Phosphoreum* Bacteria, International ICMN Symposium, 20-21 November.
  
  9. Stewart, J.J, P and Frank, J. (1989) : MOPAC version 7.0 Seiler Research laboratory, U.S. Air Force Academy, Colorado Spering, CO 80840-6258.USA.