

PENGARUH PARAKUAT TERHADAP PRODUKSI HIDROGEN PEROKSIDA SECARA FOTOKIMIA DALAM KOROPLAS DAUN BAYAM (*Spinacia oleraceae* L.)

(PARAQUAT EFFECT ON PHOTOCHEMICAL PRODUCTION OF HYDROGEN PEROXIDE IN CHLOROPLAST OF *Spinacia oleraceae* L.)

Paini Sri Widayati *)

ABSTRACT

The phytotoxicity of paraquat was suggested due to the production of toxic superoxide during the interaction of paraquat and photosystem 1, on the other hand it is also suggested that the paraquat free radical itself is the toxicant. In this study, the effect of paraquat in the production of hydrogen peroxide in chloroplast of spinach leaves (*Spinacia oleraceae* L.), which is formed from superoxide in the presence of superoxide dismutase and water, was investigated under the influence of irradiation time, amount of oxygen and pH.

The result showed that hydrogen peroxide was produced even if there is no paraquat added, meaning that the enzymes activity, such as superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, dehydroascorbate reductase and glutathione reductase, cancelled the phytotoxicity of hydrogen peroxide normally produced in chloroplast. Hydrogen peroxide production increases as paraquat is added, the irradiation time and the amount of oxygen present increases. The optimum pH for hydrogen peroxide production was 8. Further study using supernatant, chloroplast pellet and both supernatant and chloroplast pellet, showed that paraquat was acting as electron acceptor for electrons generated by photosystem 1 and catalyzing the hydrogen peroxide production. This result explain the desiccant effect of paraquat.

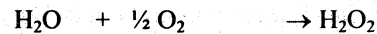
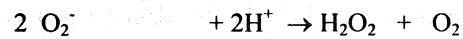
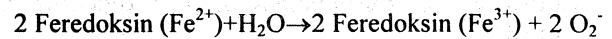
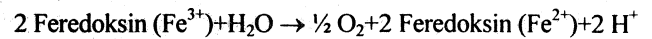
Keywords : paraquat, hydrogen peroxide, chloroplast of *Spinacia oleraceae* L.

PENDAHULUAN

Proses fotosintesis merupakan peristiwa sintesis yang terjadi pada tanaman yang terdiri dari serangkaian reaksi fotokimia dengan melibatkan sejumlah enzim. Dalam proses tersebut diperlukan senyawa karbon dioksida dan molekul air sehingga dihasilkan senyawa organik dan molekul oksigen. Proses tersebut dapat berlangsung dengan adanya enersi yang berasal dari matahari atau sumber lain yang enersinya sesuai dan adanya klorofil atau sejenisnya dalam tanaman (Foyer, 1984).

Oksigen yang dihasilkan dari proses fotosintesis dapat terlibat didalam reaksi fasa terang sehingga dihasilkan berbagai macam spesies aktif oksigen.

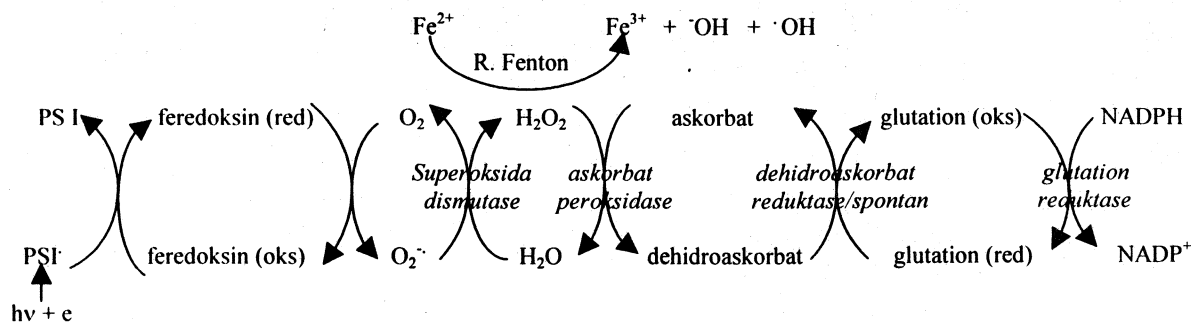
Keterlibatan molekul oksigen dalam reaksi fotosintesis dapat memberikan efek toksik terhadap jaringan tumbuh-tumbuhan. Tingkat toksisitas molekul oksigen sangat ditentukan oleh tingkat reaktifitas spesies aktif yang dihasilkan, hal ini meliputi : superoksida (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2) dan hidroksil radikal ($\cdot OH$) (Halliwell, 1981). Proses fotosintesis pada dasarnya terbagi menjadi dua bagian yaitu reaksi fasa terang dan reaksi fasa gelap. Masing-masing spesies aktif tersebut dihasilkan dalam reaksi fasa terang dengan melibatkan pusat reaksi pada organel kloroplas, yaitu P_{680} (fotosistem II / PS II) dan P_{700} (fotosistem I / PS I) dan sejumlah pembawa transfer elektron. Feredoksin sebagai pembawa transfer elektron sangat berperanan penting dalam mengubah molekul oksigen menjadi superoksida. Mekanisme reaksi sebagai berikut (Halliwell,1981):



Sedangkan hidroksil radikal dapat dihasilkan dari reaksi Fenton berikut ini :

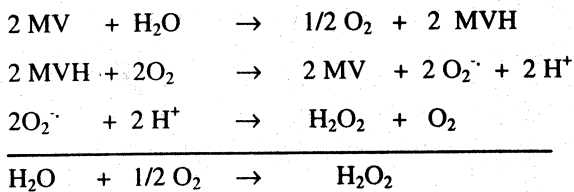


Berdasarkan tingkat toksisitas spesies aktif oksigen yang dihasilkan dapat dinyatakan bahwa hidroksil radikal lebih besar toksisitasnya daripada superoksida dan peroksida, sedangkan superoksida lebih toksik dari hidrogen peroksida. Atas dasar reaksi tersebut diatas tampak bahwa secara natural hidrogen peroksida dihasilkan dalam proses fotosintesis, namun produk tersebut akan terurai akibat aktivitas enzim askorbat peroksidase menjadi molekul air. Gambaran pembentukan spesies aktif oksigen dan keterlibatan sejumlah enzim dalam proses fotosintesis fasa terang adalah sebagai berikut :



*) Fakultas Teknologi Pertanian UWM Surabaya

Parakuat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridinium / metil viologen) merupakan herbisida yang banyak digunakan dalam lahan pertanian untuk membunuh tanaman gulma. Sebagian besar petani di lahan tanah gambut di Kalimantan menggunakan bahan ini untuk mengatasi tanaman pengganggu. Pada dasarnya herbisida ini sangat efektif, karena sistem kerjanya sangat cepat, khususnya dalam sistem transpor elektron. Menurut Homer et al., (dalam Halliwell, 1981) parakuat dapat terlibat dalam proses fotokimia karena mempunyai redoks potensial sebesar 0,44 volt. Berdasarkan siklus skema Z bahwa redoks potensial senyawa ini mendekati sama dengan redoks potensial dari feredoksin sebesar 0,42 - 0,49 volt, oleh karena itu sangat dimungkinkan senyawa ini dapat menggantikan fungsi dari feredoksin atau bekerja sama dengan feredoksin dalam menghasilkan spesies aktif oksigen. Halliwell (1981) telah menentukan pengaruh metil viologen (MV) dalam proses fotokimia dengan reaksi sebagai berikut :



Berdasarkan mekanisme keterlibatan parakuat dalam proses transfer elektron maka akumulasi spesies aktif oksigen dalam sistem tumbuhan dapat mengakibatkan peroksidasi lipid, merusakkan membran dan akhirnya menyebabkan kematian pada tanaman. Akumulasi tersebut dapat terjadi karena jumlah pembentukan spesies aktif oksigen melebihi kapasitas enzim *superoksida dismutase*, *katalase* dan *peroksidase* untuk menetralisasi.

Dari macam spesies aktif oksigen yang dihasilkan, hidrogen peroksida mudah dideteksi dengan spektrofotometri didasarkan pada kemampuannya mengoksidasi I⁻ menjadi I₃⁻ pada panjang gelombang 325 nm dalam larutan buffer kalium phtalat yang mengandung amonium molibdat sebagai katalis.

TUJUAN PENELITIAN

1. Mengetahui pengaruh tingkat keasaman (pH), lama penyinaran, kadar oksigen dan konsentrasi parakuat terhadap aktivitas kloroplas pada medium isotonik terhadap produksi hidrogen peroksida pada proses fotosintesis.
2. Mengetahui keterlibatan mediator transfer elektron terhadap produksi hidrogen peroksida pada proses fotosintesis.

METODE PENELITIAN

Alat dan bahan yang digunakan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun bayam (*Spinacia oleraceae L.*) yang segar dan dingin yang diperoleh dari pasar lokal tradisional. Bahan kimia yang digunakan adalah berkualitas analitis (analytical grade) produksi E. Merck, meliputi : NaCl, MgCl₂, EDTA (Etilen diamin tetra acetic acid), NaOH, H₂SO₄, Tris [(hidroksi-metil)metilglisin], KI, Amonium

molibdat tetrahidrat, Kalium hidrogen phtalat, Parakuat (1,1'-dimetil, 4,4'-bipiridilium diklorida / metil viologen) H₂O₂ dan gas oksigen (Praxair).

Peralatan yang digunakan adalah penghalus, lampu TL, pemusing, neraca analitik merk Shimadzu libror AEL-200, Spektrofotometer UV-Vis merk Hitachi 150-20, kertas saring Whatman 42, dan peralatan gelas.

Penyiapan sumber klorofil

Daun bayam segar yang sudah didinginkan dicuci dengan akuades sampai bersih untuk menghilangkan residu pestisida dan tanah, kemudian dihomogenisasikan untuk mendapatkan sampel mendekati sama untuk semua bagian. Selanjutnya timbang sampel 10 ± 0,0010 gram sampel lalu dihaluskan dengan medium isotonik pH 7,4 yang berisi 0,3 M NaCl, 3 mM MgCl₂, 0,5 mM EDTA dan 0,05 M Tris. Suspensi disaring dan filtrat disentrifuse pada 6000 rpm selama 90 detik, kemudian kloroplas padat (pelet) yang diperoleh dilarutkan kembali dalam medium buffer isotonik yang berisi 0,2 M sukrosa, 3 mM MgCl₂, 0,5 mM EDTA dan 0,05 M Tris dalam kondisi dingin dan dipusingkan kembali untuk mendapatkan kloroplas padat yang utuh (Underwood dan Gould, 1980).

Deteksi produksi hidrogen peroksida

Kloroplas padat (pelet) yang dilarutkan dalam medium isotonik yang mengandung 0,3 mM sukrosa, 3mM MgCl₂, 0,5 mM EDTA dan 0,05 M Tris dideteksi produksi H₂O₂ dari aktivitas fotosintesis dengan variasi lama penyinaran, kadar oksigen, pH dan konsentrasi parakuat.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Tingkat keasaman medium isotonik (pH)

Pengaruh pH digunakan untuk menentukan pH optimum pembentukan H₂O₂ dalam reaksi fotokimia. Kloroplas padat (pelet) yang diresuspensikan dalam medium isotonik yang berisi 0,3 mM sukrosa, 3mM MgCl₂, 0,5 mM EDTA dan 0,05 M Tris tingkat keasaman (pH) divariasi dari 5 - 12. Dari penelitian diperoleh pH optimum adalah 8, yang menunjukkan keterlibatan enzim *superoksida dismutase* (SOD) dalam pembentukan H₂O₂ (pH optimum 7,4).

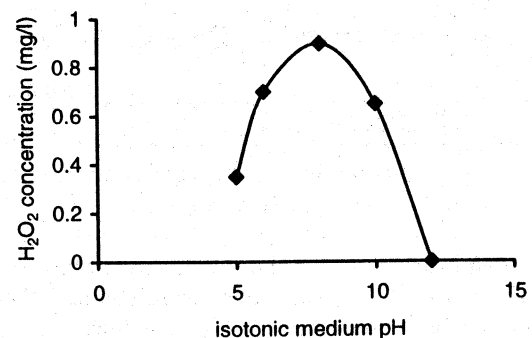


Figure 1. pH effect on photosynthesis process of hydrogen peroxide production on isotonic medium

Pengaruh Lama Penyinaran

Proses fotosintesis dapat berlangsung memerlukan energi yang berasal dari matahari atau sumber lain yang mempunyai energi yang sesuai. Proses ini dapat berlangsung pada kloroplas yang terisolasi sesuai dengan kondisi kloroplas pada keadaan sebenarnya. Lama waktu penyinaran berkorelasi positif terhadap laju proses fotosintesis, hal ini ditandai dengan meningkatnya produk H_2O_2 . Namun korelasi ini tidak selalu berbanding lurus pada kondisi tertentu laju proses fotosintesis mencapai maksimum, ini berarti titik jenuh telah tercapai.

Titik jenuh tercapai pada saat produksi H_2O_2 mengalami ketetapan dan kondisi tersebut tidak berlangsung lama, pada waktu penyinaran 4,5 jam laju mulai menurun dan terlihat jelas pada waktu 5 jam H_2O_2 tidak dihasilkan. Hal ini disebabkan pada waktu penyinaran yang cukup lama H_2O_2 yang dihasilkan akan mengoksidasi enzim *superoksida dismutase* (SOD) sehingga aktivitas untuk mengubah superoksida menjadi H_2O_2 semakin berkurang, sehingga superoksida yang terbentuk mengoksidasi organel kloroplas dan menyebabkan kematian.

Pengaruh kadar oksigen terlarut (DO) dalam medium isotonik

Kejenuhan oksigen pada medium sangat menentukan tingkat toksisitas oksigen pada kloroplas *Spinacia oleraceae* L. Pada awalnya ditentukan kadar H_2O_2 yang dihasilkan dalam medium isolasi kloroplas yang tidak jenuh pada kondisi temperatur kamar ($\pm 29^\circ C$) dan tekanan atmosfer yang diharapkan oksigen terlarutnya (DO) maksimum 7,6 mg/L Selanjutnya medium kloroplas terisolasi dijenuhkan dengan oksigen dengan cara dialirkan secara terus-menerus selama proses fotosintesis. Oksigen terlarut yang diharapkan lebih besar dari DO pada medium tidak jenuh (maksimum 5 X).

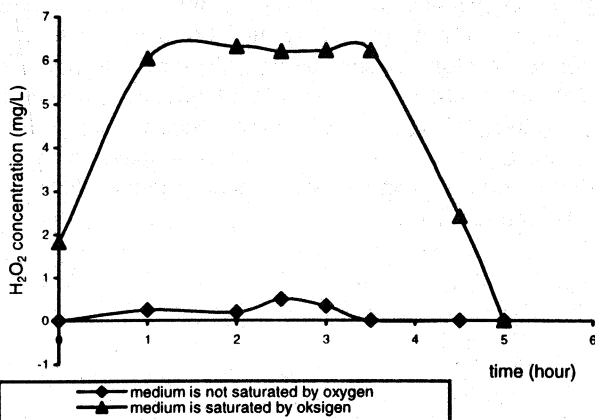


Figure 2. Irradiation time and oxygen concentration effect of hydrogen peroxide production

Peningkatan DO dalam medium isolasi kloroplas meningkatkan biosintesis superoksida menjadi H_2O_2 oleh SOD dan inaktivasi enzim yang mempunyai gugus aktif thiol (-SH) yang meliputi *katalase* dan *peroksidase* (Halliwell, 1981). Peningkatan oksigen terlarut (DO) dalam medium pada lama penyinaran yang cukup panjang

dapat menyebabkan peruraian SOD terhadap superoksida berubah menjadi hidroperoksil radikal secara terus-menerus melebihi kapasitas pertahanan sel, sehingga menyebabkan kematian sel.

Pengaruh Parakuat

Keterlibatan parakuat dalam sistem transpor elektron dapat mempertinggi toksisitas oksigen. Produksi H_2O_2 meningkat sebanding dengan konsentrasi parakuat pada medium yang jenuh oksigen maupun medium tidak jenuh oksigen. Keberadaan parakuat dalam medium jenuh oksigen meningkatkan laju pembentukan H_2O_2 lebih besar dari laju pembentukan H_2O_2 dalam medium tidak jenuh oksigen. Aksi dari SOD dan *katalase* sebagai penangkap radikal superoksida yang didukung oleh asam askorbat, glutation dan vitamin E masih tidak cukup melindungi produksi superoksida (dengan parakuat dan oksigen) dalam jangkauan kapasitas pertahanan kloroplas.

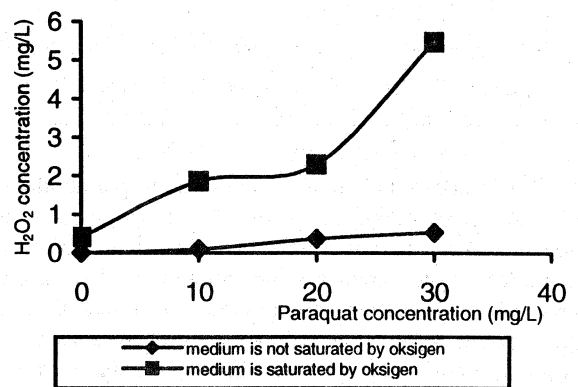


Figure 3. Paraquat effect of hydrogen peroxide production on isotonic medium

Pengaruh parakuat pada sistem reaksi fotokimia diuji dengan menentukan pengaruhnya pada cairan kloroplas dan membran fotosintesis. Semua ini didapatkan dengan cara pemusingan kloroplas padat (pelet) yang dilarutkan dalam medium isotonik yang berisi buffer dalam kondisi dingin terdiri dari 0,3 mM sukrosa, 3mM $MgCl_2$, 0,5 mM EDTA dan 0,05 M Tris dipusingkan pada 6000 rpm selama 2 menit. Kloroplas padat (pelet) yang diperoleh mengandung membran fotosintesis dan supernatan berisi cairan kloroplas.

Tabel 1. The paraquat action of hydrogen peroxide production on electron transfer mediator

Electron transfer mediator	Paraquat addition (mg/L)	H_2O_2 production (mg/L)
Supernatant (Chloroplast fluida)	0	0,4589
	100	0,4012
Chloroplast pellet (photosynthesis membran)	0	0,8897
	100	2,7054
Supernatant and chloroplast pellet (Chloroplast fluida and photosynthesis membran)	0	4,6569
	100	6,7951

Penambahan 100 mg/L parakuat tidak mempunyai efek yang nyata dalam produksi H_2O_2 , hal ini disebabkan tidak terdapat sumber elektron enersi tinggi (PS II) yang ada hanya stroma dengan feredoksin yang mobil dan FAD. Sedangkan membran fotosintesis penambahan parakuat dapat berfungsi sebagai akseptor elektron dari PS I dalam membran tilakoid menggantikan fungsi feredoksin maupun bekerja sama dengan feredoksin dapat memacu produksi superoksida dan secara nyata meningkatkan produksi H_2O_2 . Dalam medium campuran antara cairan kloroplas dan membran fotosintesis parakuat dapat berfungsi paralel dengan feredoksin sebagai penangkap elektron sehingga meningkatkan produksi H_2O_2 .

KESIMPULAN

Parakuat (redoks potensial 0,44 volt) bertindak sebagai akseptor paralel dengan feredoksin (salah satu akseptor elektron pada proses fotosintesis) yang mempunyai redoks potensial 0,42 - 0,49 volt.

Parakuat bertindak secara simultan dan paralel dengan feredoksin meningkatkan toksisitas oksigen. Penentuan fitotoksitas parakuat memerlukan elektron enersi tinggi dari reaksi peruraian molekul air, dengan demikian parakuat menyebabkan dehidrasi bagian dari tanaman yang mempunyai penyusun fotosintesis.

DAFTAR PUSTAKA

Allen, J.F., 1975, (dalam Halliwell, 1981, Chloroplast Metabolism, The Structure and Functional of Chloroplast in Green Leaf Cells, Claredon Press, Oxford), Biochem. Biophys. Res. Commun., 66,36-43.

- Ashton, F.M., 1981, Mode of Action of Herbicides, Second Edition, A Willey interscience publication, John Willey and sons, New York.
- Ashton, F.M., O.T. de Villiers, R.K. Glenn, dan W.B. Duke, 1977, Localization of Metabolic Sites of Action Herbicides, Pestic. Biochem. Physiol., 7,122-144.
- Foyer, C.H., 1984, Photosynthesis, A. Willey Interscience Publication, John Willey and Sons, New York.
- Halliwell, 1981, Chloroplast Metabolism, The structure and Functional of Chloroplast in Green Leaf Cells, Claredon Press, Oxford)
- Jennings R.C., dan Forti, G., 1975, In Proceedings of the International Congress on Photosynthesis, (ed. M. Avron), 735-743, Elsevier, Amsterdam.
- Klassen, N.V., D. Marchington, dan H.C.E., 1981, Hydrogen peroxide Determination by the I_3^- Method and by $KMnO_4$ Titration, Anal. Chem. 66,2921-2925.
- Kok, B.R., J. Rurainski, dan O.V.H. Owens, 1965, The Reducing Power Generated in Protoact. I of Photosynthesis, Biochem. Biophys. Acta, 109, 347-356.
- Mees, G.C., 1960, Experiments on the Herbicidal Action of 1,1'-ethylene-2,2'-dipyridinium dibromida, Ann. App. Bio., 48,601-612.
- Salin, M.L., dan S.M., Sherman, 1975, Biology A Human Approach, Oxford University Press, London.
- Underwood, C., dan J.M. Gould, 1981, Modulation of Proton Efflux from Chloroplast in the Light by External pH, Arch. Biochem. Biophys., 204,241-6.