

## INHIBISI INSEKTISIDA KARBAMAT DAN ORGANOFOSFAT PADA ASETIKHLINESTERASE LEBAH MADU

Iip Izul Falah

Jurusan Kimia, Fakultas MIPA UGM, Yogyakarta, Indonesia

Tel. +62 (0274) 545188

### Abstract

It is generally already accepted that organophosphate and carbamate insecticides function due to their ability to disrupt the transmission of impulses at certain synaptic junctions in the nervous system by inhibition of acetylcholinesterase. Type of inhibition reaction of carbamate (Baycarb and MIPC) and organophosphate (Dichlorvos and Monochrotophos) insecticides on honey-bee acetylcholinesterase (AChE) is shown in this investigation.

For this study, the enzyme was produced by extraction of honey-bee heads using 0.01 M and pH 7.0 aqueous phosphate buffer solution, while N-methylindoxyl acetate (MIA) in absolute methanol at concentration of 0.005 g/mL was used as a substrate stock solution. Enzyme activity was detected using HPLC spectrofluorometer at 450 nm and 495 nm for excitation and emission wavelength, respectively.

Based on detection of initial reaction rate between the enzyme with carbamate or organophosphate, it could be concluded that the reactions were competitive inhibition.

**Keywords:** inhibition, acetylcholinesterase, carbamate, organophosphate.

### Intisari

Secara umum sudah diterima bahwa fungsi insektisida-insektisida karbamat dan organofosfat disebabkan oleh kemampuannya mengganggu transmisi impuls pada sambungan sinaptik dalam sistem syaraf dengan menginhibisi asetilkholinesterase. Tipe reaksi inhibisi insektisida-insektisida karbamat (Baycarb dan MIPC) dan organofosfat (Dichlorvos dan Monocrotophos) pada asetilkholinesterase lebah madu disajikan dalam investigasi ini.

Untuk penelitian ini, enzim dihasilkan dengan mengekstraksi kepala lebah madu menggunakan larutan bufer fosfat 0,01 M dan pH 7,0 dalam air, sedangkan N-metilindoksil asetat (MIA) dalam metanol dengan konsentrasi 0,005 g/mL digunakan sebagai larutan persediaan substrat. Aktivitas enzim dideteksi menggunakan spektrofotometer HPLC, berturut-turut pada 450 nm dan 495 nm untuk panjang gelombang eksitasi dan emisi.

Berdasarkan pada pengamatan laju reaksi awal antara enzim dengan karbamat atau organofosfat, dapat disimpulkan bahwa reaksi-reaksi tersebut merupakan inhibisi kompetitif.

**Kata kunci:** inhibisi, asetikholinesterase, karbamat, organofosfat.

### 1. PENDAHULUAN

Tahun 2005 salah satu merek pembasmi nyamuk yang mengandung bahan aktif insektisida dichlorvos dilarang diperjual-belikan karena dianggap berbahaya untuk kesehatan, sehingga penelitian berkaitan dengan pestisida tetap menarik.

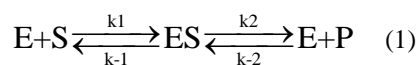
Mekanisme kerja insektisida secara umum adalah dengan menghambat kerja enzim. Dalam tubuh mahluk hidup, enzim berfungsi sebagai biokatalis dengan cara menurunkan energi aktivasi (Palmer, 1985) untuk mengendalikan aktivitas kimia sel hidup. Aktivitas katalis enzim dahulu diduga hanya diperlihatkan oleh

sel-sel utuh, tetapi sekarang sebagian besar enzim telah dapat diekstraksi dari sel hidup tanpa kehilangan aktivitas katalisnya. Inhibitor enzim dapat menurunkan laju reaksi dengan cara berikatan dengan enzim, sehingga mencegah enzim bergabung dengan substrat secara normal (Smith, 1983). Selain dengan adanya inhibitor, laju reaksi juga tergantung pada pH larutan (Page, 1985). Hansch dkk. (1966) telah membuktikan bahwa karbamat dan esterfosfonat berfungsi sebagai insektisida karena menginhibisi aktivitas enzim asetilkolinesterase.

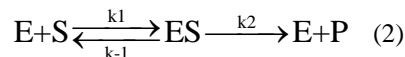
Hidrolisis suatu substrat dengan adanya katalis enzim dan inhibitor insektisida dapat dimanfaatkan untuk analisis insektisida. Dalam hal ini, Krause (1978), Blass (1991), McGravey (1989) dan She, dkk. (1984) telah meneliti metode analisis metilkarbamat menggunakan teknik labeling fluorometrik pasca kolom HPLC. Teknik ini menjadi penting karena pestisida karbamat termasuk senyawa mudah terurai dalam kondisi panas (Muller dan Stan, 1990), sehingga sulit dianalisis dengan metode GLC. Untuk analisis organofosfat, Nunes dkk. (2001) dan Andreescu dkk. (2002) telah mengembangkan metode analisis amperometrik dengan melibatkan enzim asetilkolinesterase, dan Salfi (2004) telah mendaftarkan patent di Eropa untuk analisis karbamat dan organofosfat dalam air, pangan dan minuman menggunakan metode inhibisi enzim asetilkolinesterase.

Inhibisi terhadap enzim dapat dibedakan menjadi empat macam, yaitu (1) Kompetitif (*competitive*), (2) Bukan kompetitif (*Non-competitive*), (3) Tidak kompetitif (*Un-competitive*) dan (4) Inhibisi campuran. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jenis inhibisi yang terjadi untuk insektisida karbamat dan organofosfat.

Teori kinetika reaksi antara substrat S, dengan enzim E, mula-mula diajukan oleh Michaelis dan Menten (Palmer, 1985), yang menganggap bahwa reaksi antara substrat S, dan enzim E, adalah reversibel dan membentuk kompleks Enzim-Substrat ES, yang kemudian terdekomposisi menjadi E kembali serta produk P, sesuai persamaan reaksi:



Pada periode awal, pembentukan ES dari produk P dapat diabaikan sehingga persamaan (1) dapat ditulis menjadi:



Laju pembentukan produk P pada periode awal:  
 $v_o = d[P]/dt = k_2[ES]$  (3)

Dari persamaan ini dapat diturunkan persamaan Lineweaver-Burk:

$$\frac{1}{v_o} = \frac{K_m}{V_{maks}} \frac{1}{[S]_o} + \frac{1}{V_{maks}} \quad (4)$$

di mana:

$K_m$  adalah konstanta Michaelis-Menten,

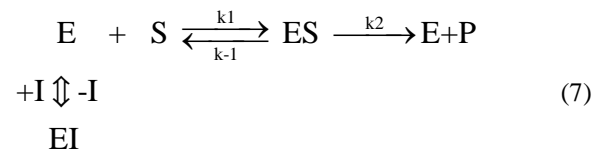
$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad (5)$$

$V_{maks}$  adalah laju reaksi maksimum,  $V_{maks} = k_2[E]_o$  (6)

$[S]_o$  dan  $[E]_o$  berturut-turut adalah konsentrasi substrat dan konsentrasi enzim awal.

Reaksi antara substrat S, dengan enzim E, sebagaimana digambarkan dalam persamaan reaksi (2) akan terhambat apabila dalam larutan terdapat inhibitor I. Dalam hal ini ada empat kemungkinan jenis reaksi inhibisi yang terjadi yaitu:

1. Inhibisi kompetitif:



Dalam hal ini dapat diturunkan hubungan  $v_o$  dengan  $[S]_o$  sebagai berikut:

$$\frac{1}{v_o} = \frac{K'_m}{V_{maks}} \frac{1}{[S]_o} + \frac{1}{V_{maks}} \quad (8)$$

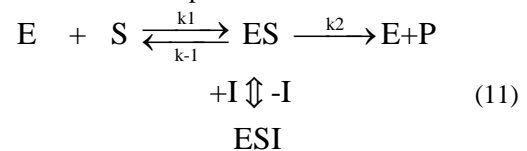
di mana  $K'_m = K_m \left( 1 + \frac{[I]_o}{K_i} \right)$  (9)

$K_i$  adalah konstanta keseimbangan inhibisi,

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad (10)$$

$[I]_o$  adalah konsentrasi inhibitor awal

2. Inhibisi tidak kompetitif:



Untuk jenis kompetisi ini dapat diturunkan hubungan  $v_o$  dengan  $[S]_o$  sebagai berikut:

$$\frac{1}{v_o} = \frac{K''_m}{V'_{maks}} \frac{1}{[S]_o} + \frac{1}{V'_{maks}} \quad (12)$$

di mana 
$$K_m'' = \frac{K_m}{\left(1 + \frac{[I]_o}{K_i}\right)} \quad (13)$$

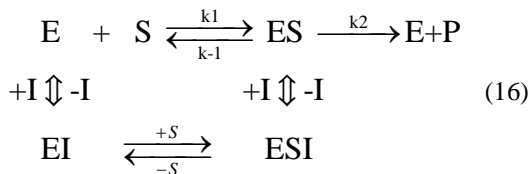
dan 
$$V_{maks}' = \frac{V_{maks}}{\left(1 + \frac{[I]_o}{K_i}\right)} \quad (14)$$

$K_i$  adalah konstanta keseimbangan inhibisi,

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad (15)$$

$[I]_o$  adalah konsentrasi inhibitor awal

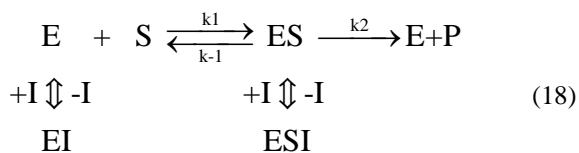
3. Inhibisi bukan kompetitif:



Hubungan  $v_o$  dengan  $[S]_o$  dapat dinyatakan sebagai berikut:

$$\frac{1}{v_o} = \frac{K_m}{V_{maks}} \frac{1}{[S]_o} + \frac{1}{V_{maks}} \quad (17)$$

4. Inhibisi campuran:



Persamaan Lineweaver-Burk yang menyatakan hubungan  $v_o$  dengan  $[S]_o$  adalah sebagai berikut:

$$\frac{1}{v_o} = \frac{K_m''}{V_{maks}''} \frac{1}{[S]_o} + \frac{1}{V_{maks}''} \quad (19)$$

dimana 
$$V_{maks}'' = \frac{V_{maks}}{\left(1 + \frac{[I]_o}{K_i}\right)} \quad (20)$$

$$K_m''' = K_m \frac{\left(1 + \frac{[I]_o}{K_i}\right)}{\left(1 + \frac{[I]_o}{K_i}\right)} \quad (21)$$

dan 
$$K_i = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \quad (22)$$

Perbedaan dari ke empat jenis reaksi inhibisi di atas apabila dibandingkan dengan reaksi tanpa inhibisi adalah apabila dibuat kurva  $\frac{1}{v_o}$  lawan  $\frac{1}{[S]_o}$ , maka

nilai kemiringan dan intersepnya tidak terkait langsung dengan salah satu dari  $K_m$  atau  $V_m$ , atau tidak terkait langsung dengan ke dua-duanya.

## 2. METODOLOGI PENELITIAN

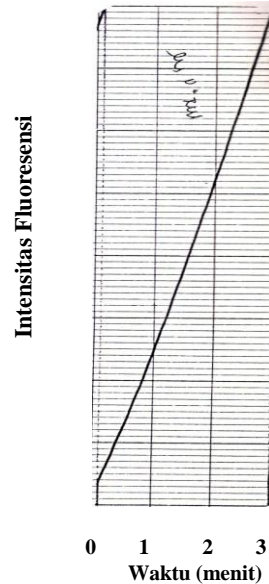
**Bahan yang digunakan.** Bahan kimia  $KH_2PO_4$ ,  $KOH$ , dan metanol absolut yang digunakan berasal dari Merck (Darmstadt, Jerman) dengan kualitas p.a. Akuades diperoleh dari Laboratorium Kimia Fisika Fakultas MIPA Universitas Gadjah Mada. Lebah madu diperoleh dari peternak lebah madu di daerah Imogiri Bantul Yogyakarta. Enzim asetilkolinesterase belut listrik untuk standar diperoleh dari Sigma Chemical Company (St. Louis, MI, Amerika). N-metilindoksil asetat (MIA) berasal dari Serva GMBH (Heidelberg, Jerman). Menurut Guibault dkk. (1968) senyawa ini menunjukkan hidrolisis non-enzimatik sangat lambat pada pH 7,0-7,5 dimana pada daerah pH ini laju hidrolisis enzimatik mencapai maksimum. Baycarb, MIPC, Dichlorvos dan Monocrotophos diperoleh dari Lamers & Pleuger ('s Hertogenbosch, Nederland) dengan kemurnian 99%, kecuali MIPC dengan kemurnian 95%.

**Alat yang digunakan.** Semua alat gelas yang digunakan berkualitas pyrex. Untuk deteksi hasil reaksi digunakan Fluorometer Waters 420 AC, dengan panjang gelombang eksitasi dan emisi, berturut-turut 450 nm dan 495 nm, dan dilengkapi dengan sel deteksi

10 µL. Untuk mengukur volume dalam skala µL digunakan *syringe* HPLC kualitas analitik buatan SGE.

**Cara kerja.** Larutan bufer fosfat dibuat dari  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  yang dilarutkan dalam akuabides, kemudian ditambahkan larutan KOH sehingga diperoleh larutan bufer dengan konsentrasi 0,01 M dan pH = 7. Larutan substrat dibuat dengan melarutkan 5,0 mg N-metilindoksil asetat dalam 1 mL metanol absolut dan disimpan dalam botol tertutup rapat. Larutan enzim asetilkolinesterase diperoleh dari hasil ekstraksi 25 kepala lebah madu menggunakan 5 mL larutan bufer fosfat 0,01 M dengan pH = 7. Dipilihnya penggunaan enzim asetilkolinesterase dari kepala lebah madu karena lebah madu mudah diperoleh, dan menurut Ernst dkk. (1977) ekstraksi enzim dari kepala lebah madu dengan cara ini menghasilkan larutan enzim asetilkolinesterase murni. Agar aktivitas enzim asetilkolinesterase dalam kepala lebah madu tidak hilang, lebah madu dimatikan dengan cara dimasukkan dalam freezer. Larutan enzim yang dihasilkan distandarisasi menggunakan enzim asetilkolinesterase standar produk Sigma, sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 0,3 unit. Dalam standarisasi ini, dicampurkan 6 µL metanol absolut, 100 µL larutan enzim, dan 6 µL larutan substrat. Campuran dikocok dengan cepat kemudian diamati laju reaksi awalnya ( $v_o$ ), yang merupakan kemiringan (slope) intensitas fluoresensi lawan waktu. Pengamatan dilakukan menggunakan Fluorometer Waters 420 AC, dengan panjang gelombang eksitasi dan emisi, berturut-turut 450 nm dan 495 nm. Data  $v_o$  antara larutan enzim standar dengan larutan enzim hasil ekstraksi dibandingkan, dan dibuat menjadi sama dengan cara mengencerkan larutan enzim hasil ekstraksi. Inhibitor yang digunakan dalam eksperimen ini adalah insektisida karbamat (Baycarb, dan MIPC) dan insektisida organofosfat (Dichlorvos dan Monocrotophos). Untuk larutan awal dibuat masing-masing larutan insektisida dalam metanol dengan konsentrasi sebagaimana dicantumkan dalam Tabel 1. Untuk analisis inhibisi enzim, ke dalam

botol reaksi tertutup dimasukkan 400 µL bufer fosfat 0,01 M dengan pH = 7, kemudian ditambahkan 5 µL metanol absolut (x), 1 µL larutan inhibitor (y), dan 6 µL larutan substrat (z). Volume larutan inhibitor divariasasi dari 0 sampai 6 µL, volume larutan substrat divariasasi dari 7 sampai 10 µL, dan volume metanol ditambahkan sedemikian rupa sehingga  $x + y + z = 16$



**Gambar 1.** Hubungan intensitas fluoresensi dengan waktu untuk laju reaksi awal.

µL. Prosedur kerja ini diterapkan untuk semua inhibitor (insektisida) yang digunakan dalam penelitian ini. Dalam penelitian ini, untuk aktivitas enzim diamati dengan mendeteksi produk isoindol yang terbentuk menggunakan detektor HPLC Fluorometer Waters 420 AC, dengan panjang gelombang eksitasi dan emisi, berturut-turut 450 nm dan 495 nm, dilengkapi dengan sel deteksi (kuvet) 10 µL, sehingga enzim yang diperlukan sangat sedikit. Sejauh penelusuran peneliti, metode deteksi seperti ini belum pernah dilakukan sebelumnya oleh peneliti lain.

**Tabel 1.** Konsentrasi awal inhibitor

No.	Nama Insektisida	Rumus molekul	Konsentrasi (g/mL)
1.	Baycarb	$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{O}_2\text{N}$	$5,5 \times 10^{-6}$
2.	MIPC	$\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{O}_2\text{N}$	$6,4 \times 10^{-6}$
3.	Dichlvos	$\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_4\text{PCl}_2$	$1,4 \times 10^{-5}$
4.	Monocrotophos	$\text{C}_7\text{H}_{16}\text{O}_3\text{NPS}$	$3,9 \times 10^{-6}$

### 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Inhibisi asetilkolinesterase dalam penelitian ini dilakukan dengan mengamati laju awal pembentukan

produk ( $v_o$ ) hidrolisis N-metilindoksil asetat, menggunakan Fluorometer Waters 420 AC. Hubungan antara intensitas fluoresensi dengan konsentrasi dapat dituliskan dalam persamaan:

$$F = \emptyset I_0 (1 - e^{-abc}) \quad (23)$$

dimana F adalah intensitas fluoresensi;  $\emptyset$  adalah efisiensi;  $I_0$  adalah intensitas cahaya awal (eksitasi); a adalah absortivitas molar; b adalah tebal sel; dan c adalah konsentrasi. Untuk larutan yang sangat encer, persamaan dapat disederhanakan menjadi:

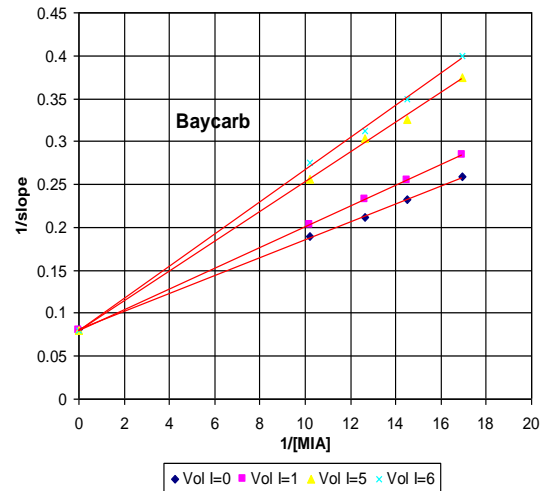
$$F = \emptyset I_0 abc \quad (24)$$

Sebelum membahas hasil eksperimen inhibisi asetilkolinesterase oleh berbagai insektisida, termasuk penting untuk dibuktikan terlebih dahulu apakah larutan yang dideteksi dalam eksperimen memenuhi persamaan (24). Pada awal reaksi ( $v_0$ ), jumlah produk yang terbentuk (yang bersifat fluoresen) masih sangat sedikit sehingga pengurangan jumlah reaktan dapat diabaikan. sehingga akan mengakibatkan pada awal reaksi, perubahan intensitas fluoresensi linear dengan berubahnya waktu. Hal ini telah dibuktikan dengan mengamati perubahan intensitas dengan berubahnya waktu sebagaimana disajikan dalam Gambar 1, dimana dalam gambar ini ditunjukkan garis lurus perubahan fluoresensi dengan berubahnya waktu. Hal ini juga sekaligus menunjukkan bahwa asumsi pada periode awal, pembentukan ES dari produk P dapat diabaikan sehingga persamaan (1) dapat ditulis menjadi persamaan (2), terpenuhi.

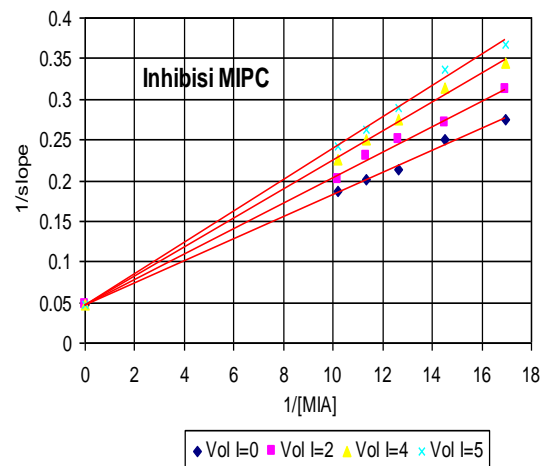
**Tabel 2.** Laju reaksi awal hidrolisis N-metilindoksil asetat (MIA) pada konsentrasi katalis enzim asetilkolinesterase tetap, dengan adanya inhibitor Baycarb.

No.	Volume MIA (uL)	Volume Baycarb (uL)	Laju Reaksi Awal (mol.L <sup>-1</sup> .menit <sup>-1</sup> )
1.	7	1	3,049
2.	8	1	3,344
3.	9	1	3,802
4.	10	1	4,329
5.	7	2	2,907
6.	8	2	3,145
7.	9	2	3,636
8.	10	2	4,115
9.	7	3	2,833
10.	8	3	3,135
11.	9	3	3,559
12.	10	3	4,016
13.	7	4	2,762
14.	8	4	3,049
15.	9	4	3,484
16.	10	4	3,906
17.	7	5	2,673
18.	8	5	2,985
19.	9	5	3,322
20.	10	5	3,817

Setelah diketahui bahwa hasil percobaan yang dilakukan memenuhi asumsi yang diterapkan, selanjutnya dilakukan penentuan laju reaksi pada



**Gambar 2.** Inhibisi insektisida Baycarb terhadap katalis enzim asetilkolinesterase dalam reaksi hidrolisis MIA

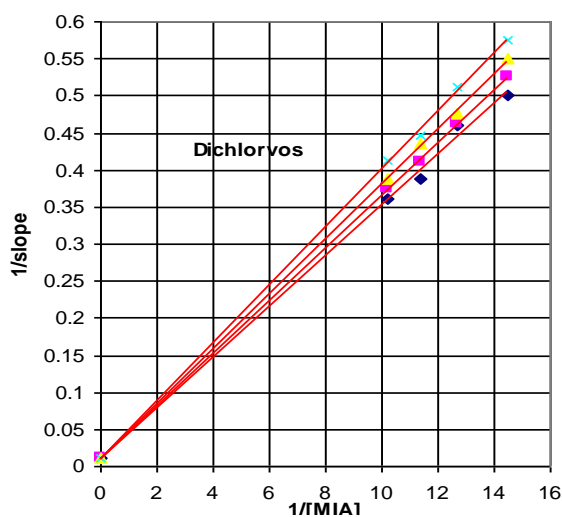


**Gambar 3.** Inhibisi insektisida MIPC terhadap katalis enzim asetilkolinesterase dalam reaksi hidrolisis MIA

kondisi substrat, MIA, dan inhibitor yang divariasi. Hasil pengukuran untuk inhibitor Baycarb disajikan dalam Tabel 2. Data dalam Tabel 2, kemudian diproses sehingga menghasilkan Gambar 2. Untuk insektisida yang lainnya (MIPC, Dichlorvos, dan Monocrotophos) dilakukan hal yang sama sehingga dihasilkan Gambar 3, Gambar 4, dan Gambar 5. Untuk menentukan

apakah inhibisi asetilkolinesterase oleh insektisida yang diamati termasuk inhibisi kompetitif, tidak kompetitif, bukan kompetitif, atau inhibisi campuran, perlu ditinjau terlebih dahulu perbedaan antara persamaan (8), persamaan (12), persamaan (17), dan persamaan (19). Perbedaan antara persamaan-persamaan ini adalah bahwa untuk persamaan (8), laju reaksi maksimum ( $V_{maks}$ ) bukan merupakan fungsi konsentrasi inhibitor awal, sehingga apabila dilakukan satu seri eksperimen dengan konsentrasi substrat divariasi, pada konsentrasi inhibitor awal tetap; dibandingkan dengan seri eksperimen lain dengan konsentrasi substrat divariasi, pada konsentrasi inhibitor awal tetap yang berbeda dari seri eksperimen pertama, maka kedua seri eksperimen ini akan menghasilkan  $V_{maks}$  yang sama. Dengan kata lain, apabila dibuat kurva  $1/v_o$  lawan  $1/[S_o]$ , untuk kedua eksperimen tersebut akan dihasilkan nilai intersep, ( $1/V_{maks}$ ), yang sama. Untuk persamaan (12), persamaan (17), dan persamaan (19), laju reaksi maksimum ( $V_{maks}$ ) merupakan fungsi konsentrasi inhibitor awal, sehingga apabila dilakukan satu seri eksperimen dengan konsentrasi substrat divariasi, pada konsentrasi inhibitor awal tetap; dibandingkan dengan seri eksperimen lain dengan konsentrasi substrat divariasi, pada konsentrasi inhibitor awal tetap yang berbeda dari seri eksperimen pertama, maka kedua seri eksperimen ini akan menghasilkan  $V_{maks}$  yang berbeda. Dengan kata lain, apabila dibuat kurva  $1/v_o$  lawan  $1/[S_o]$ , untuk kedua eksperimen tersebut akan dihasilkan nilai intersep, ( $1/V_{maks}$ ), yang berbeda.

Dari hasil eksperimen yang telah dilakukan,

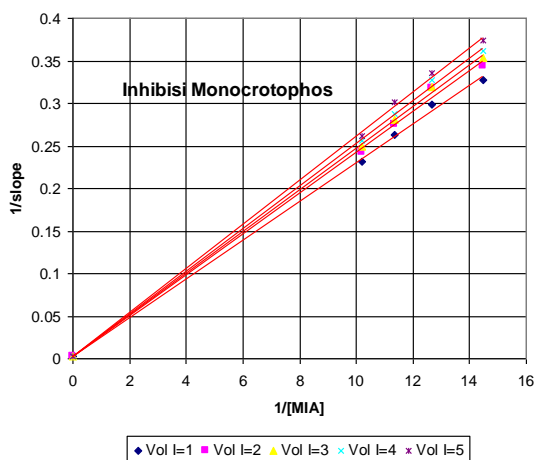


**Gambar 4.** Inhibisi insektisida Dichlorvos terhadap katalis enzim asetilkolinesterase dalam reaksi hidrolisis MIA

sebagaimana ditunjukkan dalam Gambar 2, Gambar 3, Gambar 4, dan Gambar 5, untuk ke empat insektisida yang diamati, ternyata semua kurva  $1/v_o$  lawan  $1/[S_o]$ , dimana  $[S_o]$  adalah konsentrasi N-metilindoksil asetat pada awal reaksi,  $[MIA]$ , untuk jenis insektisida yang sama, meskipun konsentrasi insektisida awal ( $[I_o]$ ) berbeda, telah menghasilkan intersep yang praktis sama. Hal ini menunjukkan bahwa insektisida Baycarb, MIPC, Dichlorvos, dan Monocrotophos dapat menghambat kerja enzim asetilkolinesterase sebagai katalis hidrolisis MIA, dengan jenis inhibisi kompetitif.

Suatu permasalahan yang muncul dari hasil pengolahan data adalah: seharusnya apabila digunakan konsentrasi enzim yang sama, maka akan dihasilkan laju reaksi maksimum yang sama. Dari kurva  $1/slope$  lawan  $1/[MIA]$ , ternyata intersep yang menunjukkan laju reaksi maksimum, untuk insektisida Baycarb, MIPC, Dichlorvos, dan Monocrotophos, nilainya berbeda-beda, meskipun perbedaannya tidak terlalu besar. Hal ini dimungkinkan karena walaupun telah diusahakan dengan teliti, tetapi dalam kenyataannya masih ada sedikit perbedaan konsentrasi enzim yang digunakan.

Dengan memperhatikan persamaan (9) dan persamaan (10), slope dan intersep Gambar 2, Gambar 3, Gambar 4, dan Gambar 5, dari keempat insektisida yang diteliti, dapat diperkirakan bahwa Dichlorvos merupakan insektisida paling toksik (menghambat paling kuat), selanjutnya berturut-turut Monocrotophos, Baycarb, dan terakhir MIPC. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Falah (1994) yang menghasilkan nilai konstanta keseimbangan  $K_i$  0,020



**Gambar 5.** Inhibisi insektisida Monocrotophos terhadap katalis enzim asetilkolinesterase dalam reaksi hidrolisis MIA

$\mu\text{M}$ , 0,021  $\mu\text{M}$ , 1,22  $\mu\text{M}$ , dan 3,95  $\mu\text{M}$  berturut-turut untuk Dichlorvos, Monocrotophos, Baycarb, dan MIPC.

#### 4. KESIMPULAN

Semua insektisida karbamat dan organofosfat yang diteliti, dapat menginhibisi fungsi asetilkolinesterase dari lebah madu sebagai katalis hidrolisis N-metilindoksil asetat dengan jenis inhibisi kompetitif, dengan urutan kekuatan inhibisi Dichlorvos > Monocrotophos > Baycarb > MIPC.

#### REFERENSI

- Andrescu, S., Avramescu, A., Bala, C., Magearu, V. dan Marty, J-L., 2002, Detection of Organophosphorus Insecticides with Immobilized Acetylcholinesterase – Comparative Study of Two Enzyme Sensors, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Vol. 374, No. 1, 39-45.
- Blass, W., 1991, Determination of Methylcarbamate Residues Using On-Line Coupling of HPLC with a Post Column Fluorometric Labelling Technique, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 339(6), 340-343.
- Ernst, G. F., Pieterse, C., dan Martens, L. J. H., 1977, Comparison of Drosophila, Rat-liver, and Bee-head Esterases in Detecting Residues of Organophosphorus and Carbamate Pesticides in Vegetables and Fruits, *J. Chromatogr.*, 133, 245-251.
- Falah, I. I. dan Hammers, W.E., 1994, The Kinetics of the Inhibition of Electric Eel and Honeybee Head Acetylcholinesterase by Organophosphorus Pesticides and N-Methylcarbamates, Using N-Methylindoxylacetate as the Substrate, *Toxicological and Environmental Chemistry*, Vol. 42, p. 19-34
- Guibault, G. G., Sadar, M. H., Glazer, R., dan Skou, C., 1968, N-Methylindoxyl Esters as Substrates for Cholinesterase, *Anal. Letters*, 1(6), 365-379.
- Hansch, C., 1966, The Use of Substituent Constant in Study of Structure Activity Relationship in Cholinesterase Inhibitors, *Biochim. Biophys. Acta*, 126, 126-129.
- Krause, R. T., 1978, Further Characterization and Refinement of an HPLC Post-Column Fluorometric Labelling Technique for The Determination of Carbamate Insecticides, *J. Chromatogr. Sci.*, 16, 281-288.
- McGravey, B. D., 1989, Liquid Chromatographic Determination of N-Methylcarbamate Pesticides Using a Single-Stage Post-Column Derivatization Reaction and Fluorescence Detection, *J. Chromatogr.*, 481, 445-451.
- Muller, H. M. dan Stan, H. J., 1990, Thermal Degradation Observed with Different Injection Techniques: Quantitative Estimation by the Use of Thermolabile Carbamate Pesticides, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 13, 759-736.
- Nunes, G. S., Montesinos, T., Marques, P. B. O., Fournier, D. and Marty, J. L., 2001, Acetylcholine Enzyme Sensor for Determining Methamidophos Insecticide: Evaluation of Some Genetically Modified Acetylcholinesterase From *Drosophila melanogaster*, *Analytica Chimica Acta*, Vol. 434, Issue 1, 1-8.
- Page, D. S., 1985, *Principles of Biochemistry*, Willard Grand Press, 201-230.
- Palmer, T., 1985, *Understanding Enzyme*, 2<sup>nd</sup> Edition, Ellis Horwood Limited, New York, 35, 119-123, 142-166.
- Salfi, V. L., 2004, Acetylcholinesterase Method to Detect Organophosphat and Carbamate Insecticides in Water, Foods and Beverages, *European Patent Application*, No. EP1460135A1.
- She, K. L., Brinkman, U. A. Th., dan Frei, R. W., 1984. Liquid Chromatographic Residue Analysis of Carbaryl Based on a Post-Column Catalytic Reactor Principle and Fluorogenic Labelling, *Anal. Letters*, 17(A10), 915-931.
- Smith, L. E., 1983, *Principles of Biochemistry: General Aspects*, 7<sup>th</sup> Edition, McGraw Hill Book Company, New York, 186-188.