

UJI SENSITIVITAS DAN LINEARITAS PROTOTIP DISPOSABLE BIOSENSOR KOLESTEROL BERLAPISKAN MEMBRANE POLIMER PELINDUNG

Pratondo Busono^{*)}, Subintoro, Nur Hajiyah, M. Farid W², Saor J. D²

Bidang Teknologi Rekayasa Biomedika
Pusat Teknologi Farmasi dan Medika
BPPT
e-mail: prabusono@yahoo.com

²Jurusan Fisika
Institut Pertanian Bogor
Bogor

Abstrak

Penyakit kardiovaskular dan cardiac arrest merupakan penyebab kematian di Indonesia saat ini. Salah satu penyebab penyakit tersebut adalah hypercholesterolemia, yakni meningkatnya konsentrasi kolesterol dalam darah diatas ambang yang diijinkan. Oleh karena itu estimasi konsentrasi kolesterol dalam darah menjadi sangat penting terutama dalam aplikasi klinis.

Dalam penelitian ini, kolesterol oxidase dan kolesterol esterase diimmobilisasi pada permukaan working electrode yang telah dimodifikasi dengan menggunakan teknik sol-gel. Modifikasi yang telah dilakukan pada working electrode yakni dengan mendesposisi electrode tersebut dengan partikel platina ukuran nano. Biosensor kolesterol selanjutnya dikarakterisasi secara elektrokimia dengan menggunakan cyclic voltametry dan amperometry, setelah uji morfologi dengan scanning electron microscopy dilakukan. Polimer pelindung berupa film dilapiskan pada permukaan working electrode untuk meningkatkan ketahanan lapisan enzyme pada permukaan elektroda. Respon amperometrik terhadap sampel kolesterol diukur pada potensial 0.7 V in larutan PBS. Hasil menunjukkan bahwa biosensor menghasilkan respon waktu yang cepat sekitar (6 detik) dan jangkauan kerja antara 50 mg/dl sampai dengan 250 mg/dl.

Kata kunci: *cholesterol biosensor*

1. Pendahuluan

Dari laporan hasil survey yang dilakukan oleh Departemen Kesehatan tahun 2003, penyakit cardiovascular atau gangguan sirkulasi darah seperti stroke dan serangan jantung infeksi merupakan penyakit-penyakit penyebab kematian di Indonesia. Menurut laporan WHO tahun 2002, kurang lebih 220.372 orang Indonesia meninggal pertahunnya karena serangan jantung dan 123.684 karena stroke. Penyakit *cardiovascular* terkait dengan terganggunya fungsi jantung maupun arteri (sistem peredaran darah), yakni penumpukan lemak pada dinding arteri (Ram, 2001). Beberapa faktor resiko yang menyebabkan terjadinya penyakit cardiovascular adalah usia, *gender*, faktor keturunan (genetik), kadar gula darah tinggi (*diabetes mellitus*), kadar kolesterol tinggi, tekanan darah tinggi, dan kadar *tryglycerides* yang tinggi.

Akhir-akhir ini, permintaan akan peralatan diagnostik yang mampu mendeteksi munculnya gejala penyakit-penyakit diatas semakin meningkat. Meningkatnya permintaan tersebut telah mendorong dikembangkannya teknik deteksi yang sederhana, akurat dan tidak melukai (*less invasive*). Kesemuanya tadi dapat dimungkinkan dengan digunakannya teknologi biosensor, dimana teknologi ini telah memainkan peran penting dalam mendorong dikembangkannya material baru yang mampu mengindera, menghantar sinyal dan merespon sinyal. Dewasa ini telah dikembangkan divais biosensor yang dapat mendeteksi target biologi/kimia seperti kolesterol, urea, creatinine, asam urat maupun *cholesterol* dalam ukuran mikromolar bahkan lebih kecil lagi. Salah satu jenis *biosensor* yang secara komersial sukses di pasaran adalah *disposable glucose biosensor*. Di seluruh dunia, pasar untuk biosensor berkisar 1 milyar US dollar per tahun (Arya K ,2008). Dari keseluruhan biosensor yang beredar, 99% umumnya

dalam bentuk *disposable strip electrode* yang dilengkapi dengan alat pembaca elektronik sederhana. Di Indonesia, rapid test berbasis biosensor ini banyak dijual di apotik-apotik atau toko obat. Beberapa kendala yang terkait dengan alat tersebut adalah: 1) alat biosensor tersebut umumnya masih diimpor sehingga harga per test menjadi mahal, 2) setiap elektroda biosensor tersebut hanya mampu mendeteksi 1 parameter. Dengan harga per test berkisar 25 ribu rupiah, sehingga untuk pengujian parameter lainnya seperti pengukuran kadar asam urat, urea, creatinine dan kolesterol diperlukan biaya yang mahal, 3) akurasi maupun presisi kurang, dengan kata lain bahwa hasil pengukuran yang diperoleh antara satu elektroda dengan elektroda lainnya adakalanya terjadi penyimpangan yang cukup besar, 4) dibutuhkan sampel dalam kuantitas yang besar agar diperoleh hasil pengukuran yang bagus, dan 5) respon waktu yang lama (Pratondo, 2008).

Berdasarkan atas latar belakang diatas maka akan dikembangkan prototip *disposable biosensor* yang mempunyai kemampuan multi deteksi, mempunyai respon waktu yang cepat, selektifitas yang tinggi, akurat, sensitif, stabil dan murah. Penelitian pendahuluan yang terkait dengan biosensor untuk deteksi colesterol (Coulet, 1991) dan teknik immobilisasi enzyne dan fabrikasi elektroda telah banyak dilakukan dan ribuan publikasi telah diterbitkan pada jurnal-jurnal internasional (Hee-Jin Yee, 1996). Dari ribuan publikasi tersebut, kurang dari 10% yang membahas masalah pengukuran. Ratusan publikasi terkait dengan teknik immobilisasi enzyne, pengembangan material untuk deteksi dan fabrikasi elektroda telah pula dipublikasikan (Konchi,.1999) Oleh karena itu perlu dikembangkan transducer biosensor dengan *multiple working electrodes*, dimana setiap *working electrode* tersebut selektif terhadap target yang akan dideteksi. Dalam penelitan dan pengembangan biosensor tersebut akan dilakukan: preparasi sampel, karakterisasi sampel, pemodelan dan simulasi, fabrikasi biosensor, pengembangan prototip potentiostat dan pengujian kinerja dari biosensor yang dikembangkan.

Tujuan dari penelitian ini adalah melakukan pengembangan prototip biosensor dan melakukan uji sensitivitas dan linearitas dari prototip biosensor yang telah dikembangkan, terutama *working electrode* yang telah dilapisi COx untuk deteksi kolesterol.

2. Bahan dan Metoda

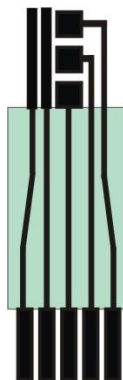
Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan untuk pembuatan strip biosensor terdiri dari lembar PVC, tinta karbon konduktif Electrodag PF-407, Silver Klorida (AgCl) Electrodag 6037SS, tinta konduktif silver (Ag) Electrodag 427SS, tinta insulator Electrodag 452SS. Bahan-bahan yang digunakan untuk uji sensitifitas dan stabilitas yaitu 1,1'-Dimethylferrocene 97% dan enzim *cholesterol oxidase* (COX) serta KCl yang akan digunakan pada uji konduktifitas.

Peralatan yang digunakan terdiri dari screen dan karet penyapu untuk pembuatan strip biosensor. Untuk uji sensitifitas dan stabilitas digunakan alat Potentiostat - Galvanostat model PG580 dari Uniscan Instruments. Sedangkan untuk pengukuran konduktivitas digunakan LCR meter (HIOKI 3532-50 LCR HiTester).

Desain Elektroda

Persiapan pembuatan biosensor diawali dengan pembuatan desain bentuk elektroda dengan menggunakan perangkat lunak grafik Corel Draw. Yang terpenting dalam mendesain bentuk elektroda adalah penentuan bentuk dan ukuran elektroda dan semua elemen dalam strip biosensor. Ukuran elektroda ditetapkan berdasarkan ukuran pada kaki pembaca yang ada pada alat potensiostat – galvanostat.



Gambar 1. Disain Elektroda Untuk Biosensor

Desain strip biosensor yang telah dibuat, dipisah-pisahkan menjadi sirkuit dan konektor, elektroda kerja, elektroda pembanding, elektroda pendukung, dan bagian cover. Pemisahan ini dilakukan karena material yang akan digunakan untuk masing-masing bagian ini berbeda satu sama lain dan akan dicetak secara bergantian. Dalam penelitian ini, elektroda kerja dibuat dengan bentuk persegi panjang berukuran 1.4 cm x 0.6 cm. Sedangkan elektroda pembanding dan elektroda pendukung juga dibuat berbentuk persegi panjang dengan ukuran masing-masing 1.4 cm x 0.09 cm dan 1.4 cm x 0.2 cm. Bagian cover dibuat dengan bentuk persegi panjang dengan ukuran sedemikian rupa sehingga bagian sirkuit dapat tertutup secara keseluruhan, dalam hal ini ukuran cover dibuat dengan ukuran sekitar 3cm x 1.9 cm.

Pembuatan Cetakan Elektroda

Desain strip biosensor yang berupa bagian yang terpisah-pisah dicetak pada kertas HVS dan akan dibentuk sebagai film/gambar negatif pada sebuah screen. Dan screen inilah yang nantinya digunakan untuk proses screen printing biosensor. Screen yang digunakan merupakan screen yang berbahan selulosa dengan luas pori-pori sebesar 180 mesh. Screen ini dibatasi oleh bingkai kayu berukuran 30 cm x 40 cm.

Persiapan berikutnya adalah pengenceran tinta dengan butyl carbitol agar tidak terlalu kental. Dengan demikian, tinta bisa meresap menembus pori-pori screen yang kecil. Tinta yang terlalu kental akan menyebabkan kesulitan dalam proses pencetakan ke lembar PVC karena tinta akan banyak tertinggal pada bagian belakang screen dan menyebabkan buruknya hasil cetakan pada lembar PVC.

Fabrikasi Biosensor

Strip biosensor dibuat dengan metode screen printing dimana lembar PVC digunakan sebagai media. Tinta dicetak pada PVC melalui screen yang berfungsi sebagai film atau gambar negatif. Pada screen dibuat bentuk-bentuk elektroda kerja, elektroda pembanding, elektroda pendukung, sirkuit, kaki konektor, sampai penutup insulator. Kemudian bagian-bagian ini dicetak satu per satu secara berurutan dari sirkuit dan kaki, kemudian elektroda pembanding, elektroda kerja, elektroda pendukung, dan terakhir penutup insulator.

Proses pencetakan sirkuit dan kaki konektor dilakukan secara bersamaan karena sama-sama menggunakan tinta konduktor perak Electrodag 427SS dan sama-sama berada pada posisi paling dasar pada lembar PVC. Sebelum dilakukan tahapan berikutnya, hasil cetakan dikeringkan terlebih dahulu dengan menempatkan pada tempat terbuka atau ditempatkan di dalam oven. Setelah sirkuit dan kaki konektor kering, selanjutnya dilakukan pencetakan elektroda acuan menggunakan bahan tinta perak klorida (AgCl) Electrodag 6037SS. Setelah proses pencetakan elektroda acuan selesai, seperti pada sirkuit dan kaki konektor, biarkan tintanya kering.

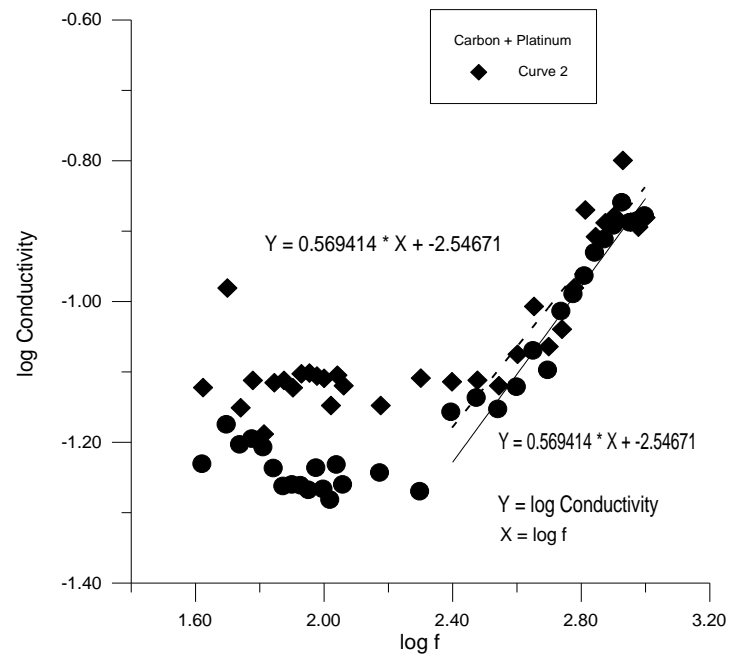
Proses berikutnya adalah pencetakan elektroda kerja dan disusul dengan elektroda pendukung. Baik elektroda kerja maupun elektroda pendukung, keduanya menggunakan tinta karbon konduktif Electrodag PF-407. Kemudian tahap terakhir adalah pencetakan cover yang menggunakan tinta insulator Electrodag 452SS. Penutup insulator dilapiskan pada bagian sirkuit sedangkan bagian elektroda dan kaki konektor tidak ditutupi oleh lapisan insulator.

3. Hasil dan Pembahasan

Uji EIS dilakukan untuk mengetahui konduktifitas dan impedansi elektroda kerja. Karakterisasi ini dilakukan dengan alat LCR meter tipe HIOKI 3532-50 LCR Hi Tester. Melalui alat ini akan didapatkan parameter yaitu konduktansi (G). Pengukuran dilakukan dengan memvariasikan frekuensi antara 40 Hz sampai 100 kHz.

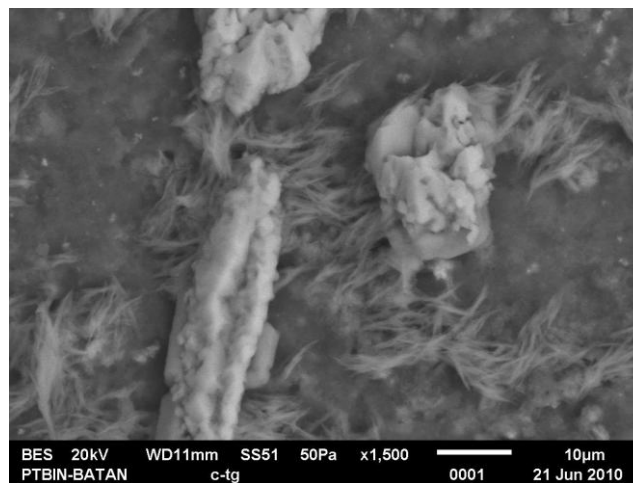
Berdasarkan data yang diperoleh, didapatkan nilai-nilai untuk $\log f$ dan $\log \sigma$ yang diplotkan sebagai grafik konduktifitas elektroda kerja pada gambar 2. Grafik konduktifitas ini menunjukkan persamaan garis lurus $y=0.569414x-2.546$ dengan kemiringan yang positif yaitu 0.569414.

Gambar 3 menunjukkan gambar fotografi dari working elektroda yang telah dilapisi oleh enzyme Cox, dari gambar tersebut terlihat bahwa enzyme Cox tidak menempel sepenuhnya pada permukaan lapisan carbon. Gambar 4 menunjukkan lapisan perak yang ditempelkan pada permukaan PVC. Terlihat bahwa bahan tinta perak tidak sepenuhnya menempel pada permukaan PVC sheet.

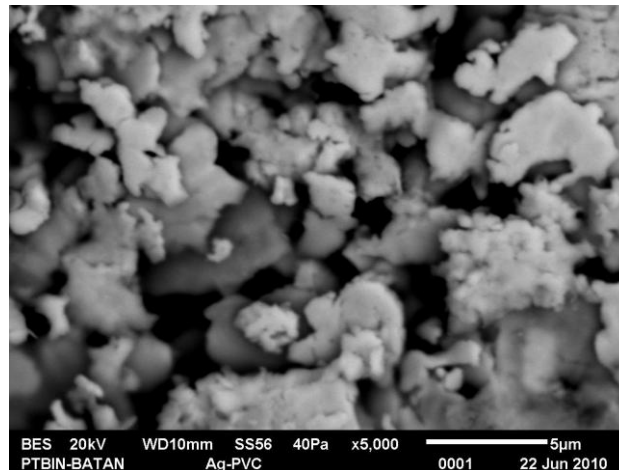


Gambar 2. Grafik Konduktifitas Elektroda kerja + KCl 2 M, log f Vs log σ

Hasil Karakterisasi SEM



Gambar 3. Bentuk morfologi permukaan elektroda kerja setelah dilapisi enzyme COx + 1,1'-Dimethylferrocene dengan perbesaran 1500 kali

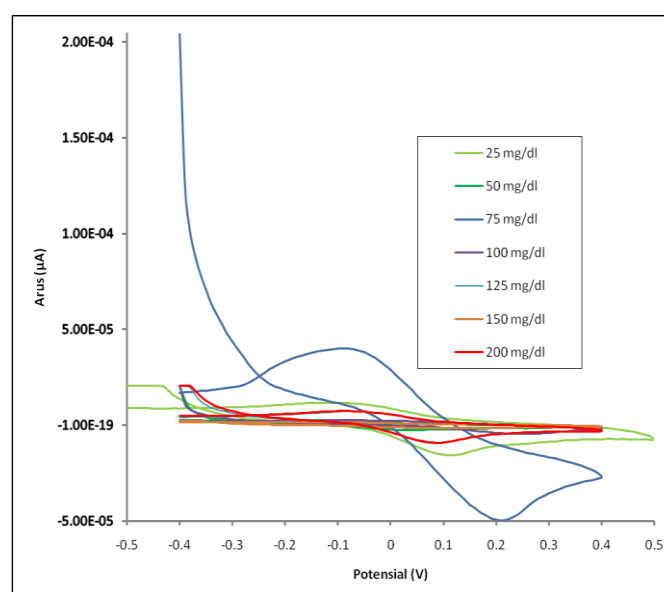


Gambar 4. Hasil SEM lapisan perak (Ag) pada permukaan PVC dengan perbesaran 5000 kali.

Hasil Karakterisasi CV (*Cyclic Voltammetry*)

Karakterisasi *cyclic voltammetry* dilakukan dengan menghubungkan strip biosensor pada reader yang ada pada alat Potentiostat - Galvanostat model PG580 dari Uniscan Instruments. Output dari alat ini ditampilkan pada komputer berupa grafik hubungan potensial (V) dan arus (μA). Variasi konsentrasi kolesterol diberikan pada strip biosensor yang sudah diimmobilisasi untuk melihat kesensitifan biosensor terhadap perbedaan konsentrasi ini. Perbedaan konsentrasi akan menghasilkan bentuk grafik yang berbeda dan puncak katodik (oksidasi) yang akan dihasilkan berbeda pula.

Voltamogram siklik biosensor untuk berbagai konsentrasi kolesterol ditampilkan pada Gambar 5. Variasi konsentrasi kolesterol yang diuji antara lain 25 mg/dl, 50 mg/dl, 75 mg/dl, 100 mg/dl, 125 mg/dl, 150 mg/dl, dan 200 mg/dl. Dari grafik tersebut dapat dilihat bahwa biosensor dengan konsentrasi kolesterol 75 mg/dl memiliki puncak katodik tertinggi dibandingkan dengan yang lain. Sementara itu kolesterol dengan konsentrasi 150 mg/dl justru memiliki puncak katodik terendah. Sedangkan untuk suatu biosensor yang ideal, semakin besar konsentrasi analit, maka semakin baik sensitifitasnya dan akan menghasilkan puncak katodik yang semakin tinggi. Demikian juga halnya dengan biosensor kolesterol ini. Adapun kecilnya arus puncak oksidasi yang dihasilkan pada konsentrasi kolesterol yang lebih tinggi disebabkan oleh adanya kolesterol yang tidak larut sempurna sehingga molekul-molekul kolesterol tidak dapat melewati membran dialisis dan tidak dapat bereaksi dengan enzim.



Gambar 5. Voltamogram siklik biosensor dengan variasi konsentrasi kolesterol.

Jika diambil nilai-nilai arus puncak untuk konsentrasi kolesterol 50 mg/dl, 125 mg/dl, dan 200 mg/dl, maka diperoleh data seperti yang terlihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Nilai arus puncak katodik (oksidasi) dengan variasi konsentrasi kolesterol

Konsentrasi (mg/dl)	Arus puncak (μA)
25	1.18E-05
50	2.57E-06
75	4.02E-05
100	2.51E-06
125	7.32E-06
150	1.63E-06
200	7.41E-06

Penentuan sensitivitas dilakukan dengan memproses lebih lanjut data pada Tabel 1 untuk mencari persamaan garis dan kemiringan. Hubungan antara arus dengan konsentrasi sampel kolesterol menghasilkan suatu persamaan linier $y = 2,01 \times 10^7 x - 14,72$. Dari persamaan tersebut dapat dikatakan bahwa sensitivitas biosensor kolesterol ini sebesar $2,01 \times 10^7 \mu\text{A} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{dl}$. Ini merupakan nilai sensitivitas yang sangat besar yang berarti biosensor ini memiliki sensitivitas yang baik. Pola linieritas ini memiliki kemiringan yang positif yang menunjukkan bahwa sensitivitas biosensor kolesterol terhadap konsentrasi kolesterol dimana semakin tinggi konsentrasi sampel kolesterol maka arus puncak yang dibentuk akan semakin besar.

Tabel 2 adalah hasil pengujian prototip biosensor dengan sampel standard yakni kolestesterol dengan konsentrasi sekitar 100 mg/dl pada 15 hari sejak biosensor difabrikasi. Biosensor ditutup dengan lapisan pelindung polimer. Jumlah sampel prototip biosensor yang diuji sebanyak 20 buah untuk memenuhi persyaratan statistik. Dari data tersebut diperoleh nilai deviasi sebesar 2.31. Terlihat bahwa penyimpangan rata-rata antara hasil deteksi dengan nilai standard relatif cukup kecil 2.262.

Tabel 2. Data Hasil Pengukuran kolesterol standard 100 mg/dl setelah 15 hari fabrikasi.

No	Kode Sample	Hasil Pengukuran	Perbedaan dengan sample standard
1	KLST-1	101,191	-1,191
2	KLST-2	103,789	-3,789
3	KLST-3	101,684	-1,684
4	KLST-4	106,138	-6,138
5	KLST-5	102,072	-2,072
6	KLST-6	102,504	-2,504
7	KLST-7	101,222	-1,222
8	KLST-8	102,219	-2,219
9	KLST-9	102,103	-2,103
10	KLST-10	101,312	-1,312
11	KLST-11	101,612	-1,612
12	KLST-12	101,483	-1,483
13	KLST-13	101,604	-1,604
14	KLST-14	101,298	-1,298
15	KLST-15	102,351	-2,351
16	KLST-16	112,171	-2,171
17	KLST-17	101,920	-1,920
18	KLST-18	105,345	-5,345
19	KLST-19	101,079	-1,079
20	KLST-20	101,136	-1,136
Rata-rata		102,862	-2,262

Tabel 3 adalah hasil pengukuran setelah 15 hari sejak biosensor dibuat. Tidak ada lapisan pelindung pada permukaan biosensor. Disini terlihat bahwa terjadi penyimpangan yang cukup besar. Hal ini disebabkan karena ada bagian enzyme yang lepas sehingga daya deteksi biosensor menjadi berkurang. Deviasi berkisar 12%.

Tabel 3.

Tabel 1. Data Hasil Pengukuran kolesterol standar 100 mg/dl tanpa lapisan pelindung setelah 15 hari fabrikasi.

No	Kode Sample	Hasil Pengukuran	Perbedaan dengan sample standard
1	KLST-1	119,912	-19,912
2	KLST-2	104,148	-4,148
3	KLST-3	102,010	-2,010
4	KLST-4	102,406	-2,406
5	KLST-5	107,364	-7,364
6	KLST-6	103,285	-3,285
7	KLST-7	107,841	-7,841
8	KLST-8	111,759	-11,759
9	KLST-9	102,010	-2,010
10	KLST-10	111,987	-11,987
11	KLST-11	104,503	-4,503
12	KLST-12	109,088	-9,088
13	KLST-13	104,141	-4,141
14	KLST-14	106,058	-6,058
15	KLST-15	103,149	-3,149
16	KLST-16	135,398	-35,398
17	KLST-17	103,751	-3,751
18	KLST-18	102,050	-2,050
19	KLST-19	135,422	-35,422
20	KLST-20	160,638	-60,638
Rata-rata		111,846	-11,846

3. Kesimpulan

Dari hasil penelitian diperoleh kesimpulan berikut:

- Prototip biosensor multideteksi telah berhasil digunakan untuk mendeteksi konsentrasi kolesterol standar.
- Biosensor kolesterol mempunyai jangkauan kerja dari 50 mg/dl sampei dengan 200 mg/dl, dimana pada daerah ini linieritas masih terjaga. Melebihi daerah tersebut, penyimpangan yang cukup signifikan pada pengukuran akan terjadi.
- Dengan melapisi polimer pada permukaan elektroda diperoleh informasi bahwa kemampuan deteksi alat menjadi berkurang, akan tetapi stabilitas biosensoe terjaga.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini didanai dari Proyek Insentif Ristek Untuk Riset Terapan dengan kode RT-55, tahun 2008-2010.

Daftar Pustaka

Arya, S.K., Datta, M., Bansi, D.M. (2007), “ *Recent Advances in Cholesterol Biosensor*”, www.sciencedirect.com.



Ram, M.K., Bertoncello, P., H.Ding, Sergio, P., Claudio, N. (2001), “*Cholesterol Biosensors Prepared By Layer-By-Layer Technique*”, www.elsevier.com/locate/bios.

Pratondo Busono, (2008). “Laporan Teknis Pengkajian dan Penerapan Teknologi Biosensor dan Monitor Untuk Deteksi Dini Gangguan Metabolisme dan Kefaaalan Tubuh, BPPT.

Cagnini, I. Palchetti, I. Lioni, M. Mascini, A.P.F. Turner (1995), “Disposable ruthenized screen-printed biosensors for pesticides monitoring”, *Sensors and actuators B* 24-25, (1995), 85-89.

IP.R.Coulet, G.Bardeletti, and F.Sechaud, (1991) “ Amperometric Enzyme Membran Electrodes”, In *Bioinstrumentation and Biosensors* (editor Donald E.Wise), Marcel Dekker Inc, New york, 229-249.

Hee-Jin Yee, J.Kyun Park, Sung – tae Kim (1996), “ Disposable Thick-Film Amperometric Biosensor with multiple working Electrodes Fabricated on a single substrate, *Sensor and Actuators B* 34, 490-492.

R. Konchi, S. Glab, J. Dziwulska, I. Palchetti, M. Mascini (1999), “Disposable strip potentiometric electrodes with-solvent-polymeric ion-selective membranes fabricated using screen-printing technology”, *Analytica Chimica Acta*, 385, 1-3, 451-459.