

PENGEMBANGAN TEKNIK IMMOBILISASI ENZIM *GLUCOSE OXIDASE* PADA MEMBRAN KOMPOSIT BERBASIS KITOSAN DAN UJI APLIKASINYA UNTUK PEMBUATAN BIOSENSOR GLUKOSA

Asep Muhamad Samsudin

L4C009018

Program Magister Teknik Kimia Universitas Diponegoro
Jln. Prof. Soedarto, SH. Kampus Tembalang Semarang 50275

Abstrak

Tingginya prevalensi penyakit Diabetes mellitus (DM) di Indonesia dan mahal nya harga biosensor sebagai alat diagnosa, memotivasi pelaksanaan penelitian untuk pembuatan biosensor. Immobilisasi enzim yang menghasilkan stabilitas tinggi merupakan kunci sukses dalam pembuatan biosensor. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan teknik immobilisasi enzim yang dapat menghasilkan stabilitas tinggi dan penerapannya untuk pembuatan biosensor. Enzim Glucose oxidase (GOx) diimmobilisasi dengan ikatan kovalen pada membran komposit berbasis kitosan. Membran berbasis kitosan dibuat dengan metode kombinasi EIPS dan NIPS. Membran yang telah dibuat dikarakterisasi meliputi permeabilitas air, morfologi dan komposisi kimianya. Immobilisasi enzim dilakukan dengan cara merendam membran yang telah diaktivasi dengan Glutraldehyde (GA) 1% dalam larutan enzim Glucose Oxidase (GOx). Enzim GOx yang diimmobilisasi pada membran teraktivasi memberikan konsentrasi enzim terikat lebih besar dan kestabilan yang lebih lama dibandingkan tanpa aktivasi. pH optimum untuk Immobilisasi GOx didapat pada pH 5. Konsentrasi larutan enzim berpengaruh terhadap konsentrasi enzim yang terikat. Didapat K_m dan V_{maks} masing-masing sebesar 0,36 mM dan 102 mM/menit. Teknik Immobilisasi yang dikembangkan kemudian diterapkan pada aplikasi biosensor glukosa dan perilaku elektrokimianya dipelajari. Konfigurasi 3 (E-M-K&CNT-Ez) menghasilkan puncak oksidasi terbesar dengan arus sebesar 2,3 mA.

Kata Kunci : Immobilisasi, Glucose oxidase, biosensor glukosa, ikatan kovalen

PENDAHULUAN

Diabetes mellitus (DM) merupakan salah satu penyakit degeneratif yang menjadi permasalahan di seluruh dunia. Kelainan metabolisme ini diakibatkan oleh penurunan kadar insulin dengan ditandai dengan kadar glukosa yang kurang dari rentang 80-120 mg/dl (4,4-6,6 mM) (Wang, 2008). *Diabetes mellitus* bisa menyebabkan kematian dan cacat pada

tubuh. Banyak komplikasi dari penyakit ini diantaranya penyakit jantung, gagal ginjal atau kebutaan.

Menurut data WHO, Indonesia menempati urutan ke-4 terbesar dalam jumlah penderita *Diabetes mellitus (DM)* di dunia. Prevalansi *Diabetes mellitus (DM)* termasuk tinggi di Indonesia yaitu mencapai 7,5% pada tahun 2001 dan 10,4% pada tahun 2004. (Depkes RI, 2008). Untuk menekan tingginya

prevalensi *Diabetes mellitus* di Indonesia, tindakan pencegahan dan diagnosa dini merupakan langkah yang mutlak dilakukan. Namun hal ini terkendala dengan tingginya harga *kit* diagnostik yang merupakan produk impor. Akibatnya, banyak penderita penyakit ini tidak dapat melakukan tindakan pencegahan maupun diagnosa dini. Oleh karena itu, upaya untuk mencapai kemandirian dalam pembuatan *kit* diagnostik merupakan hal yang harus mendapat perhatian secara serius. Biosensor yang mampu menggabungkan selektivitas reseptor biologis dan transduser sebagai media deteksi, telah banyak diaplikasikan di berbagai bidang kehidupan termasuk untuk keperluan diagnosa terhadap penyakit degeneratif.

Biosensor glukosa ini memiliki pangsa pasar yang mencapai 85% dari keseluruhan pasar biosensor dunia (Wang, 2008). Hal ini menjadikan biosensor glukosa sebagai model untuk penelitian dan pengembangan biosensor adalah langkah yang tepat.

Sampai saat ini ada tiga generasi biosensor glukosa yang dapat dijadikan model pengembangan. Generasi pertama adalah biosensor yang mendasarkan pada konsumsi oksigen atau pembentukan hidrogen peroksida (Wang, 2008). Kelemahan mendasar dari generasi ini adalah bahwa kinerja alat sangat bergantung pada konsentrasi oksigen dalam darah dan membutuhkan overpotensial yang cukup tinggi. Untuk memecahkan permasalahan ini, biosensor generasi kedua telah diusulkan dimana fungsi oksigen dalam reaksi digantikan oleh mediator transfer elektron (Wang, 2008). Permasalahan yang sering muncul pada biosensor generasi ini adalah lepasnya mediator dari ruang diantara

enzim GOx dan elektroda. Biosensor generasi ketiga muncul untuk mengeliminasi penggunaan mediator transfer elektron, dengan menggunakan elektroda dari garam organik konduktif. Elektroda ini dapat mengoksidasi enzim GOx tereduksi secara langsung pada permukaan elektroda. Namun demikian mekanisme transfer elektron menjadi kompleks dan masih menjadi perdebatan. Selain itu juga memungkinkan terjadinya gangguan (*interference*) dan masalah peracunan. (Wang, 2008).

Meskipun keberhasilan kerja biosensor glukosa dipengaruhi oleh kinerja transduser amperometrik, namun jantung dari biosensor ini adalah enzim yang mengkonversi substrat (analit) menjadi produk yang dapat memberikan sinyal elektronik kepada transduser. Oleh karena itu, teknik immobilisasi enzim merupakan hal penting yang harus diperhatikan dalam perancangan biosensor glukosa. Hal penting lain yang perlu diperhatikan dalam perancangan biosensor adalah kecepatan transfer produk (elektron) dari permukaan enzim ke permukaan elektroda. Transfer ini harus secepat mungkin untuk memberikan respon pengukuran yang cepat dan akurat.

Beberapa teknik immobilisasi untuk menjaga stabilitas enzim telah dikembangkan yang meliputi metode adsorpsi, penyekatan (*encapsulation*), penjebakan (*entrapment*) dan pengikatan secara kovalen (*covalent bonding*) (Cass, 1990). Metode adsorpsi untuk immobilisasi enzim telah diaplikasikan untuk pembuatan biosensor (Korell et al., 1993 dan Campanella et al., 1995). Lebih lanjut, metode penjebakan dalam matrik konduktif juga telah diaplikasikan (Adeloju et al., 1994 dan Adeloju et al., 1996). Teknik lain yang juga telah

dikembangkan untuk pembuatan biosensor adalah dengan *entrapment* dalam polimer organik (Bartlett dan Cooper., 1993), metode sol-gel (Miao et al., 2001 ; Sampath et al., 1997 dan Nur et al., 2010) dan pada elektroda karbon-polimer (Cespedes dan Alegret, 2000). Permasalahan yang sering muncul dari metode-metode ini adalah terjadinya pelepasan enzim dari matrik yang digunakan. Lebih lanjut, pelepasan ini akan mengakibatkan biosensor kehilangan aktivitas dan memberikan kesalahan pengukuran. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan teknik immobilisasi enzim dengan stabilitas yang tinggi dan uji penerapannya untuk pembuatan biosensor glukosa generasi kedua.

BAHAN DAN METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini antara lain kitosan (Sigma-Aldrich, Berat Molekul 190,000-310,000 Da, derajat deasetilasi 75-85%), *Glucose oxidase* (GOx) dari *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich, EC 1.1.3.4; type X-S; 245 900 units g⁻¹), glutaraldehyde (Sigma-Aldrich, 50 wt % larutan dalam H₂O), ferrocene (Merck), Carbon Nano Tube (Merck), elektroda kerja platinum (ALS Japan), elektroda pembanding Ag/AgCl (ALS Japan), elektroda pembantu platinum (ALS Japan), asam asetat, asam sulfat dan NaOH.

Peralatan yang akan digunakan pada penelitian ini antara lain alat uji permeabilitas, *Casting machine*, Potensiostat (EZstat basic, nuvant system), *fourier transform infrared* (FTIR),

Scanning Electron Microscope (SEM) dan peralatan gelas.

Metode Penelitian

Pembuatan dan Karakterisasi Membran Kitosan dan Membran Komposit Berbasis Kitosan

Membran dibuat dengan kombinasi *evaporation induced phase separation* (EIPS) dan *non solvent induced phase separation* (NIPS) dimana larutan kitosan konsentrasi tertentu di-*casting* dalam asam asetat 1% (v/v) dengan ketebalan 300 µm di atas gelas kaca menggunakan pisau *casting* dan direndam dalam larutan NaOH 2% (w/w) untuk kemudian dibilas dan dikeringkan. Membran yang telah dikeringkan kemudian dikarakterisasi lanjut yang meliputi permeabilitas air, komposisi kimia dan morfologi.

Immobilisasi Enzim dan Studi Pengaruh Aktivasi, pH dan Konsentrasi Larutan Enzim terhadap Kapasitas Pengikatan Enzim

Immobilisasi enzim GOx diawali dengan mengaktivasi membran kitosan dengan cara mengontakkan permukaan membran dalam larutan GD 1% (w/v) selama 1 jam. Setelah itu permukaan membran dikontakkan dengan larutan enzim GOx dengan konsentrasi tertentu dalam waktu 24 jam. Pada tahap ini pengaruh activator GD, pH dan konsentrasi larutan enzim terhadap kapasitas pengikatan enzim akan dipelajari.

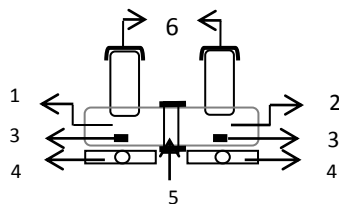
Studi Stabilitas Immobilisasi Enzim

Membran kitosan yang digunakan untuk immobilisasi enzim GOx direndam dalam larutan bufer fosfat pada pH optimum dalam jangka waktu tertentu.

Konsentrasi enzim yang terikat pada membran akan diamati dengan mengukur konsentrasi enzim GOx pada larutan buffer yang digunakan untuk merendam dalam waktu tertentu.

Pengamatan terhadap Difusi Glukosa pada Membran Komposit dan Studi Kinetika Reaksi Enzimatik

Pada tahapan ini, difusi glukosa melalui membran yang dihasilkan (tanpa keberadaan enzim) akan diamati. Hal ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan glukosa mendifusi melalui pori-pori membran. Gambar 1 menunjukkan skematik peralatan untuk studi difusi glukosa melalui membran kitosan yang dihasilkan. Percobaan yang sama dilakukan juga untuk membran yang mengandung enzim GOx terimmobilisasi untuk mempelajari kinetika reaksi enzimatik yang terjadi.



1. Sel umpan, 2. Sel permeat, 3. Magnetik, 4. Strirrer, 5. Membran, 6. Penutup sel

Gambar 1. Skema peralatan untuk pengukuran difusi glukosa melewati membran

Pembuatan elektroda kerja dan pabrikan biosensor

Elektroda kerja (*working electrode*) dibuat dengan teknik immobilisasi enzim ikatan kovalen (*covalent binding*) menggunakan Glutaraldehyde sebagai aktivator. Tiga konfigurasi penempelan membran kitosan dievaluasi. Konfigurasi pertama adalah enzim GOx diimmobilisasi

pada membran kitosan yang dibuat pada elektroda yang telah dibubuhi MTE, ferrocene. Konfigurasi kedua adalah seperti konfigurasi pertama, hanya saja ferrocene dicampurkan langsung pada larutan *casting* kitosan sehingga terbentuk membran komposit berbasis kitosan. Konfigurasi ketiga adalah dengan menambahkan carbon nanotube (CNT) pada larutan kitosan sehingga akan diperoleh membran campuran kitosan-CNT pada elektroda.

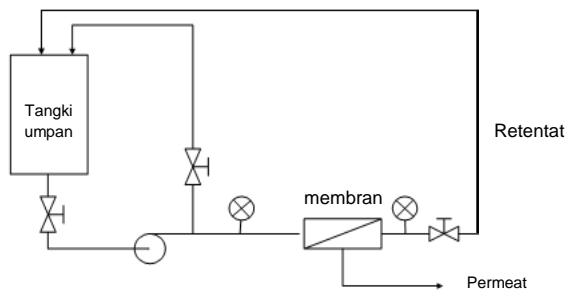
Pengamatan Perilaku Elektrokimia Biosensor

Dalam tahapan ini perilaku elektrokimia dari konfigurasi biosensor diamati. Percobaan akan dilakukan dengan menggunakan instrumen analitik elektrokimia yang terdiri dari potensiostat dan sebuah recorder berupa PC. Dalam setiap eksperimen akan digunakan tiga elektroda yaitu elektroda platina yang telah dibubuhi membran kitosan dan enzim GOx sebagai *working electrode*, elektroda platina sebagai *counter electrode* dan elektroda Ag/AgCl sebagai *reference electrode*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

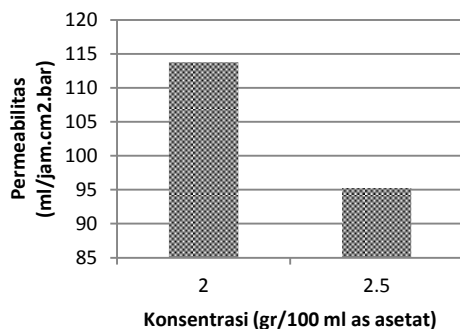
Pembuatan dan Karakterisasi Membran Kitosan dan Membran Komposit Berbasis Kitosan

Membran dibuat dengan kombinasi *evaporation induced phase separation (EIPS)* dan *non solvent induced phase separation (NIPS)* dengan pelarut asam asetat 1 % (v/v), konsentrasi kitosan 2-2,5 % (w/v), dan lama perendaman NaOH selama 2 hari.



Gambar 2. Skematik rangkaian peralatan untuk uji permeabilitas membran

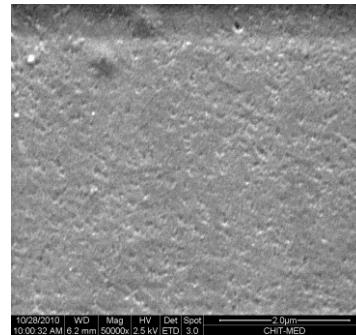
Membran yang telah dibuat kemudian dikarakterisasi meliputi permeabilitas air, morfologi dan komposisi kimianya. Karakterisasi permeabilitas air dilakukan dengan menggunakan alat uji permeabilitas membran dengan sistem *cross flow* seperti yang diperlihatkan pada Gambar 2.



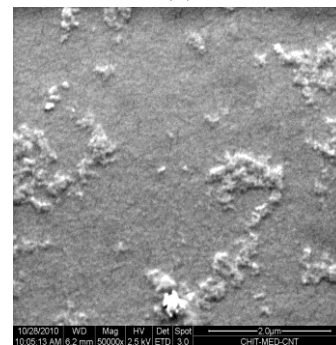
Gambar 3. Pengaruh konsentrasi KS terhadap permeabilitas membran (Tekanan 1 bar, BM Kitosan 190.000-310.000 Da)

Gambar 3 menunjukkan hubungan antara konsentrasi kitosan (2 dan 2,5 % (w/v)) terhadap permeabilitas membran, dimana permeabilitas membran dengan konsentrasi 2 % (w/v) lebih besar dibandingkan membran dengan konsentrasi 2,5 % (w/v), dimana masing-masing permeabilitasnya adalah 113 ml/jam.cm².bar dan 95 ml/jam.cm².bar. Hal ini terjadi dikarenakan bahwa semakin besar konsentrasi membran maka

membran yang dihasilkan cenderung mempunyai pori yang lebih kecil, sehingga hambatannya akan semakin besar akibatnya permeabilitas akan menjadi lebih lebih kecil. Permeabilitas merupakan salah satu parameter dari kinerja membran yang menunjukkan produktivitas membran. (Mehta dan Zidney, 2005)



(a)



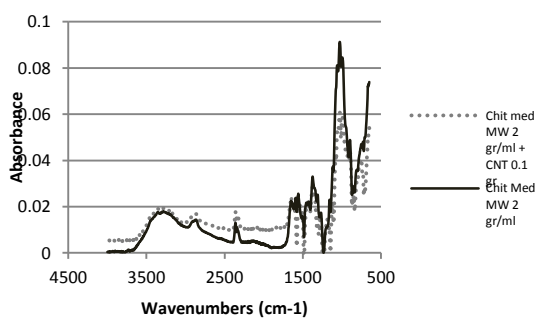
(b)

Gambar 4. Karakterisasi morfologi membran Kitosan Medium MW. (a) Medium MW 2 gr/ml (b) Medium MW 2 gr/ml + CNT 1 gr

Karakterisasi morfologi membran diamati dengan menggunakan *Scanning Electron Microscope (SEM)*. Gambar 4 menunjukkan morfologi membran kitosan *Medium molecular weight* dan membran komposit kitosan *Medium molecular weight* – Carbon Nano Tube pada perbesaran 50.000 kali. Pada Gambar 4a terlihat permukaan membran kitosan murni yang relatif halus, homogen dan terlihat pori-pori halus yang tersebar merata. Sedangkan pada Gambar 5b terlihat permukaan membran komposit

kitosan dan CNT yang tidak rata, heterogen dan terlihat permukaan kasar yang diduga sebagai CNT yang terdipersi.

Karakterisasi komposisi kimia membran diamati dengan menggunakan spektroskopi *fourier transform infrared* (FTIR). Gambar 5 menunjukkan hasil karakterisasi kimia membran kitosan murni (Medium MW 2 gr/ml) dan membran komposit kitosan (Medium MW 2 gr/ml – CNT 0,1 gr)



Gambar 5. Karakterisasi komposisi kimia membran kitosan dengan menggunakan FTIR. (a) Medium MW 2 gr/ml (b) Medium MW 2 gr/ml + CNT 1 gr

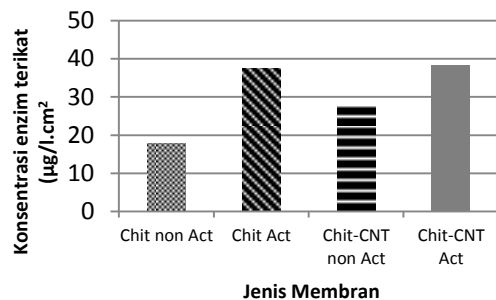
Pada Gambar 5, spektrum membran kitosan murni menunjukkan daerah serapan pada 3224 cm^{-1} yang menunjukkan gugus OH, daerah serapan pada 1558 cm^{-1} yang menandakan ikatan NH (amida) pada gugus NH_2 , daerah serapan pada 1643 cm^{-1} yang menandakan adanya ikatan C=O (karboksil). Gugus-gugus ini merupakan gugus utama yang ada pada kitosan (Osman and Arof, 2003). Hasil ini mirip dengan hasil yang diperoleh Hefian et al. (2010) dan Wu et al. (2007). Sementara pada membran kitosan-CNT, menunjukkan daerah serapan yang sama yaitu 1643 cm^{-1} yang menunjukkan ikatan C=O (karboksil). Sementara daerah yang menandakan ikatan NH (amida) pada gugus NH_2 dan gugus OH, masing-masing mengalami pergeseran menjadi 1544 cm^{-1} dan 3248 cm^{-1} . Pergeseran ini dimungkinkan

disebabkan oleh pencampuran fisika dan interaksi kimia antara kitosan dan CNT (Hefian et al.,2010)

Immobilisasi enzim dan Studi pengaruh aktivasi, pH dan Konsentrasi Larutan Enzim terhadap Kapasitas Pengikatan Enzim

Pengaruh Aktivasi

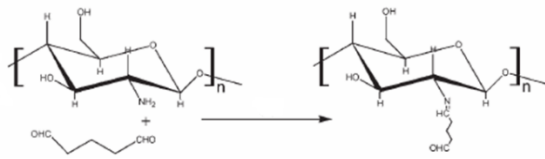
Untuk mengetahui pengaruh aktivasi terhadap pengikatan enzim, membran yang tidak diaktivasi dan diaktivasi menggunakan glutaraldehyde dibandingkan kemampuannya dalam mengikat enzim. Gambar 6 menunjukan hasil immobilisasi dengan menggunakan membran yang telah dibuat dengan dan tanpa aktivasi menggunakan glutaraldehyde.



Gambar 6. Pengaruh Aktivasi GD terhadap kapasitas pengikatan enzim

Dari hasil tersebut dapat dilihat bahwa, pengaktifan dengan glutaraldehyd mempunyai pengaruh yang signifikan terhadap banyaknya enzim yang terikat. Membran yang teraktivasi oleh glutaraldehyde memungkinkan terbentuknya ikatan kovalen antara membran kitosan dan glutaraldehyde. Hal ini dikarenakan kitosan memiliki gugus fungsional amino dan hidroksil yang bisa dimodifikasi secara kimia (Krajewska, 2004 dan Pillai et al, 2009).

Fungsionalisasi kitosan dengan glutaraldehide bisa dilihat pada Gambar 7.



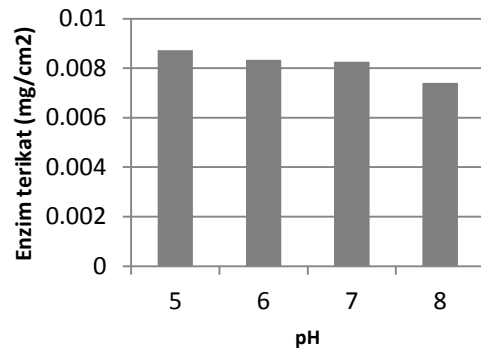
Gambar 7. Fungsionalisasi kitosan dengan glutaraldehide

Dari Gambar 6 terlihat juga bahwa immobilisasi GOx yang dilakukan pada membran komposit kitosan-CNT menghasilkan konsentrasi enzim terikat yang lebih besar dibanding membran kitosan murni. Diduga hal ini dikarenakan luas permukaan membran bertambah karena keberadaan CNT mengingat CNT didispersikan dalam kitosan. Selain itu dalam penelitian yang dilakukan oleh Wu et al. (2007) dilaporkan bahwa CNT bisa difungsionalisasi untuk meningkatkan hidrofilitasnya yang memungkinkan CNT bisa berinteraksi membentuk ikatan kovalen, absorpsi atau ikatan ion. CNT yang teraktivasi tersebut dimungkinkan berikatan dengan enzim GOx.

Pengaruh pH

Untuk mengetahui pengaruh pH larutan enzim terhadap pengikatan enzim, membran kitosan direndam dalam larutan enzim yang mempunyai pH bervariasi. Hasil percobaan pada Gambar 8 menunjukkan bahwa pH 5 menghasilkan kapasitas pengikatan enzim terbesar.

Hasil ini mirip dengan penelitian yang dilakukan oleh Yang et. al. (2004) dimana pH optimum untuk Immobilisasi Glucose oxidase pada membrane komposit kitosan pada pH 5,6.

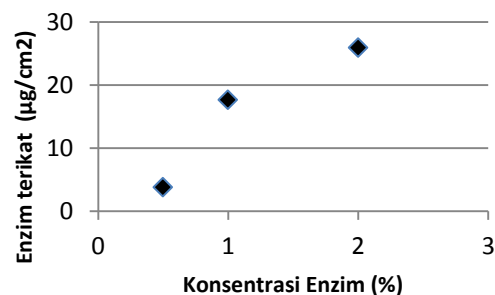


Gambar 8. Pengaruh pH terhadap kapasitas pengikatan enzim

Bankar et. al. (2009) menyatakan bahwa pH optimum untuk Glucose oxidase bervariasi antara 5-7. Glucose oxidase dari kebanyakan jamur dan ragi (*yeast*) mempunyai pH optimum dalam rentang asam sampai netral seperti *A. niger* dan *P. chrysogenum* menunjukkan pH optimum 5 – 6 (Kalisz et al., 1991 dan Bankar et. al., 2009)

Pengaruh Konsentrasi Enzim

Gambar 9 menunjukkan pengaruh konsentrasi enzim terhadap kapasitas pengikatan enzim. Semakin besar konsentrasi enzim maka enzim yang terikat pada membran menjadi semakin besar tergantung dari tingkat kejenuhan gugus aktif membran kitosan terhadap enzim.

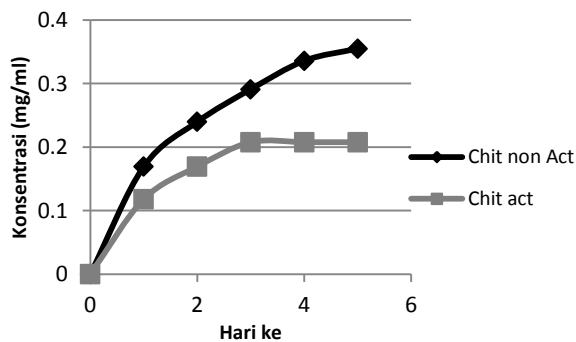


Gambar 9. Pengaruh konsentrasi enzim terhadap kapasitas pengikatan enzim

Membran yang diimmobilisasi dengan larutan enzim Glucose oxidase dengan konsentrasi 2 %, menghasilkan hasil terbaik dimana enzim yang terikat sebesar $25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Studi Stabilitas Immobilisasi Enzim

Gambar 10 menunjukkan stabilitas enzim terimmobilisasi yang direndam dalam larutan Buffer pH 5 selama 5 hari. Pada Gambar 10, Immobilisasi enzim GOx pada membran kitosan yang diaktivasi dengan Glutaraldehyde memberikan kestabilan yang lebih tinggi dibandingkan dengan immobilisasi enzim GOx membran kitosan yang tidak diaktivasi.



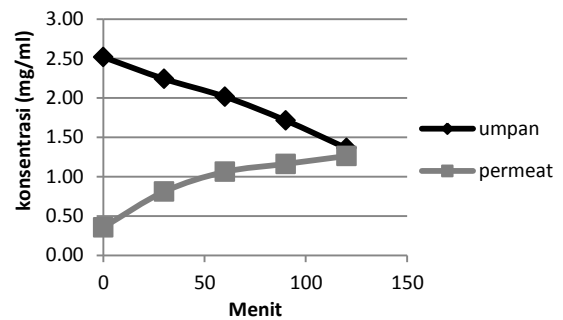
Gambar 10. Studi stabilitas immobilisasi enzim

Hal ini dikarenakan membran kitosan yang teraktivasi dengan glutaraldehyde memungkinkan terjadinya ikatan kovalen dengan enzim. Ikatan kovalen ini mempunyai kekuatan yang lebih besar dibandingkan dengan tanpa aktivasi yang hanya menghasilkan immobilisasi secara fisik saja. (Hanefeld et al., 2009 dan Ulbricht dan Papra, 1997)

Pengamatan terhadap Difusi Glukosa pada Membran Komposit dan Studi Kinetika Reaksi Enzimatik

Gambar 11 memperlihatkan fenomena perbandingan konsentrasi glukosa terhadap waktu pada umpan dan

permeat menggunakan peralatan untuk pengukuran difusi seperti pada Gambar 1. Pada Gambar 11, terlihat bahwa konsentrasi glukosa mengalami penurunan pada sel umpan. Sedangkan kenaikan konsentrasi glukosa terjadi pada sel permeat. Hal ini menunjukkan bahwa glukosa bisa berdifusi melewati membran berbasis kitosan. Sehingga pengukuran kadar glukosa pada elektroda biosensor bisa dilakukan.



Gambar 11. Perbandingan konsentrasi glukosa terhadap waktu pada umpan dan permeat

Studi kinetika enzimatik enzim GOx terimmobilisasi dilakukan dengan cara menentukan nilai K_m dan V_{maks} . V_{maks} menunjukkan kecepatan reaksi maksimum sedangkan K_m atau konstanta Michaelis-Menten menunjukkan afinitas dari enzim atau kekuatan ikatan antara enzim dan substrat (Yang et al., 2004). K_m dan V_{maks} dapat diperoleh dari persamaan Lineweaver-Burk (2) yang diturunkan dari persamaan Michaelis-Menten (1) (Cetinus dan Oztop., 2000).

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

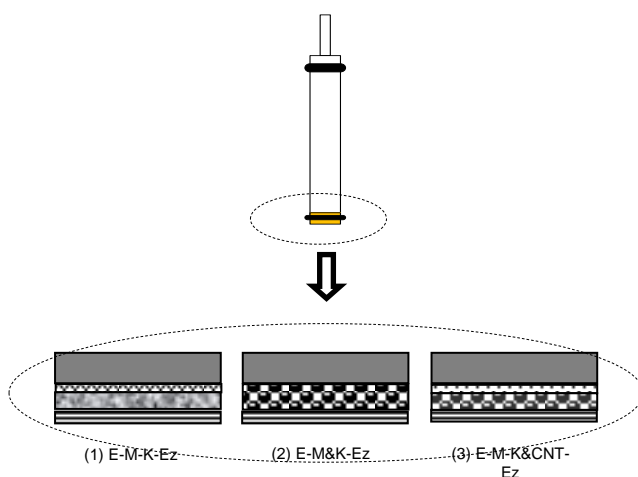
$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{maks}} \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{maks}} \quad (2)$$

Dari hasil perhitungan menggunakan persamaan Lineweaver-Burk didapat nilai K_m dan V_{maks} masing-

masing sebesar 0,36 mM dan 102 mM/menit pada pH 5.

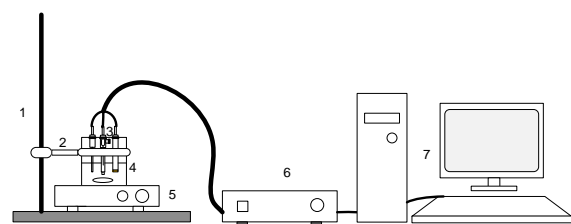
Pembuatan Elektroda Kerja dan Pabrikasi Biosensor

Elektroda kerja (*working electrode*) dibuat dengan tiga konfigurasi penempelan yang berbeda. Konfigurasi pertama adalah enzim GOx akan diimmobilisasi pada membran kitosan yang dibuat pada elektroda yang telah dibubuhi MTE, ferrocene. Konfigurasi ini memungkinkan terbentuknya ikatan kovalen antara enzim dengan kitosan dan kitosan dengan ferrocene sebagai MTE. Konfigurasi kedua adalah seperti konfigurasi pertama, hanya saja ferrocene dicampurkan langsung pada larutan *casting* kitosan sehingga terbentuk membran komposisi berbasis kitosan. Konfigurasi ketiga adalah dengan menambahkan carbon nanotube (CNT) pada larutan kitosan sehingga akan diperoleh membran campuran kitosan-CNT pada elektroda. Skematik konfigurasi biosensor yang dilakukan dapat dilihat pada Gambar 12.



Gambar 12. Skematik Konfigurasi biosensor yang dilakukan (dari atas ke bawah). E : elektroda, M: mediator transfer elektron, K: kitosan, CNT: karbon nanotube, Ez: enzim

Pada dasarnya biosensor terdiri dari tiga bagian yaitu unsur biologi (reseptor biologis), transduser, dan sistem elektronik pemroses sinyal (Wang, 2008). Reseptor biologis yang digunakan dalam pembuatan biosensor ini berupa enzim *Glucose oxidase (GOx)* dari *Aspergillus niger*. GOx diimmobilisasi dalam membran berbasis kitosan pada elektrode kerja (*working electrode*). Transduser yang digunakan pada biosensor ini adalah transduser tipe amperometri yang mengubah arus menjadi bentuk potensial (voltase). Transduser ini terintegrasi dalam potentiostat yang mempunyai beberapa fungsi yaitu mengukur dan mengontrol perbedaan potensial antara elektrode kerja dan elektrode pembanding, mengukur aliran arus antara elektrode kerja dan elektrode pembantu, Komponen primer dalam potentiostat terdiri dari *control amplifier* (menyuplai energi untuk mempertahankan potensial antara WE dan RE, *electrometer* (mengukur perbedaan potensial antara RE dan WE), *current to voltage counter* (mengukur arus antara WE dan CE) (Eggins, 2002)



(1) Statif, (2) Klem, (3) Elektroda, (4) Beaker glass, (5) Magnetic stirrer, (6) Potentiostat, (7) Komputer
Gambar 13. Skema Biosensor Glukosa

Elektroda kerja yang telah dibuat kemudian diintegrasikan dengan potentiostat dan Personal Computer untuk mencatat hasil pengukuran. Skema rangkaian biosensor ditunjukkan pada Gambar 13.

Pengamatan Perilaku Elektrokimia Biosensor

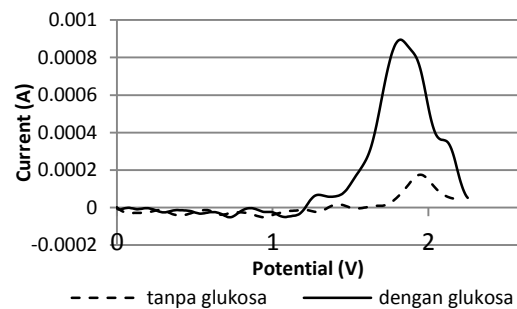
Voltametri merupakan salah satu metode elektroanalisis skala mikro yang mengkaji perilaku elektrokimia tentang analit berdasar pengukuran arus (I) sebagai fungsi potensial (V) pada kondisi dimana elektroda indikator atau elektroda kerja mengalami polarisasi. Arus yang diukur adalah arus difusi yaitu arus yang timbul karena adanya proses oksidasi atau reduksi analit elektroaktif pada permukaan elektroda (Skoog, 1994).

Beberapa teknik yang umum digunakan untuk polarisasi potensial elektroda dalam voltametri yaitu: *Linear Sweep Voltammetry* (LSV), *Siklik Voltametri* (CV), *Normal Pulse Voltammetry* (NPV), *Square Wave Voltammetry* (SWV), *Differential Pulse Voltammetry* (DPV) (Skoog, 1994).

Potensial voltametri siklik disikluskan antara dua nilai, pertama penambahan secara linier hingga maksimum kemudian berkurang secara linier dengan urutan angka yang sama. Proses ini dapat dilakukan dengan banyak pengulangan siklik dengan arus akan direkam sebagai fungsi waktu (Skoog, 1994).

Pada percobaan pengamatan perilaku elektrokimia pada penelitian ini, sel elektrokimia menggunakan larutan elektrokimia NaCl 0,5 M dengan pelarut buffer fosfat 0,06 M pH 5. Penambahan larutan elektrokimia ini dimaksudkan untuk meningkatkan migrasi elektron pada sel elektrokimia. Larutan elektrolit yang telah ditambah dengan glukosa 0,05 M diaduk dengan kecepatan rendah untuk menjaga homogenitas larutan. Perilaku elektrokimia dari beberapa kondisi sel elektrokimia biosensor kemudian dipelajari.

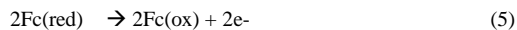
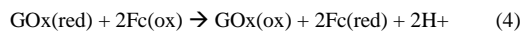
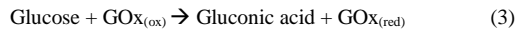
Pengaruh glukosa



Gambar 14. Perbandingan voltammogram linear biosensor tanpa glukosa dan dengan glukosa 0,05 M

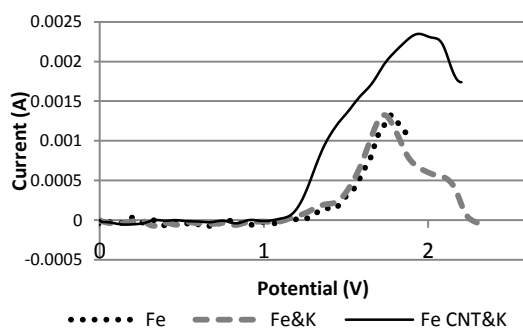
Pada Gambar 14 kita bisa melihat perbandingan voltammogram linear antara analisis voltametri tanpa glukosa dan dengan keberadaan glukosa dengan konsentrasi 0,05 M. Kondisi parameter lain dibuat sama yakni konsentrasi membran kitosan 2 % (w/v) dengan berat molekul (BM) sedang, konsentrasi ferrocene 0,05 % (w/v) dan larutan elektrolit berupa NaCl dengan konsentrasi 0,15 M. Analisis voltametri dilakukan pada *scan rate* 0,01 V/s dan dalam rentang potensial 0-2,5 V.

Dari gambar tersebut kita bisa melihat puncak oksidasi dengan keberadaan glukosa (1,8 V ; 0,9 mA) lebih besar dibandingkan dengan tanpa keberadaan glukosa (1,95 V ; 0,15 mA). Sedangkan puncak reduksi tidak terlihat pada voltammogram. Hal ini berarti bahwa reaksi berlangsung satu arah yaitu hanya berjalan proses oksidasi saja. Apabila kita menjadikan kondisi tanpa glukosa sebagai blanko, maka selisih puncak antara yang mengandung glukosa dan tidak merupakan arus murni dari reaksi redoks glukosa. Arus ini mencerminkan konsentrasi glukosa yang terukur. Reaksi (3), (4) dan (5) memperlihatkan reaksi redoks yang terjadi pada saat biosensor glukosa bekerja (Wang, 2008).



Perbandingan Tiga Konfigurasi

Gambar 15 memperlihatkan voltamogram untuk tiga konfigurasi elektroda kerja yang dibuat. Konfigurasi 1 (E-M-K-Ez) dibuat dengan urutan elektroda platina, MTE ferrocene, membran kitosan dan enzim GOx. Konfigurasi 2 (E-M&K-Ez) dibuat dengan urutan elektroda platina, komposit membran kitosan-MTE ferrocene dan enzim GOx. Sedangkan konfigurasi 3 (E-M-K&CNT-Ez) dibuat dengan urutan elektroda platina, MTE ferrocene, Komposit kitosan-CNT dan enzim GOx.



Gambar 15. Perbandingan voltammogram linear biosensor konfigurasi 1, 2, dan 3

Puncak oksidasi pada konfigurasi 1 terjadi pada potensial 1,8 V (1,3 mA). Sedangkan untuk konfigurasi 2 dan 3 masing-masing mempunyai puncak oksidasi pada potensial 1,7 V (1,3 mA) dan 1,95 V (2,3 mA). Puncak reduksi tidak terlihat untuk semua konfigurasi. Konfigurasi 1 dan 2 relatif menghasilkan tinggi puncak oksidasi yang sama yang menghasilkan besar arus sebesar 1,3 mA. Konfigurasi yang ketiga menghasilkan puncak oksidasi yang lebih besar dengan arus sebesar 2,3 mA hal ini dikarenakan

carbon nano tube (CNT) meningkatkan sensitivitas dan kecepatan transfer produk ke elektroda karena sifat CNT yang dapat meningkatkan aktivitas elektronik.

KESIMPULAN

Membran kitosan terbaik dibuat dengan kombinasi EIPS dan NIPS dimana pelarut yang digunakan adalah asam asetat 1% (v/v), konsentrasi kitosan 2 % (w/v) dan lama perendaman NaOH 2 hari.

Enzim GOx yang diimmobilisasi pada membran teraktivasi memberikan konsentrasi enzim terikat lebih besar dan kestabilan yang lebih lama dibandingkan tanpa aktivasi.

pH optimum untuk Immobilisasi GOx didapat pada pH 5. Konsentrasi larutan enzim berpengaruh terhadap konsentrasi enzim yang terikat.

Didapat K_m dan V_{maks} masing-masing sebesar 0,36 mM dan 102 mM/menit.

Konfigurasi 3 (E-M-K&CNT-Ez) menghasilkan puncak oksidasi terbesar dengan arus sebesar 2,3 mA.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kementerian Riset dan Teknologi yang telah membantu pendanaan penelitian ini melalui Insentif Riset Terapan.

DAFTAR PUSTAKA

Adelaju, S.B., Barisci, J.N., Wallace, G.G. (1996). Electroimmobilisation of sulphite oxidase into a polypyrrole film and its utilisation for flow

- amperometric detection of sulphite. *Anal. Chim. Acta* 332 (2): 145
- Adelaju, S.B., Shaw, S.J., Wallace, G.G. (1994). Polypyrrole-based amperometric flow injection biosensor for urea. *Electroanalysis* 6 (1) : 865.
- Bankar, S. B., Bule, M. V., Singhal, R. S., Ananthanarayan, L. (2009). Glucose oxidase — An overview. *Biotechnology Advances*, 27 : 489–501.
- Bartlett, P.N., Cooper, J.M. (1993). A review of the immobilization of enzymes in electropolymerized films. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 362 : 1-12
- Campanella, L. P. Cipriani, T.M., Martini, M.P., Sammartino, M., Tomassetti. (1995). New enzym sensor for sulfite analysis in sea and river water samples. *Anal. Chim. Acta* 305 : 32.
- Cass, A.E.G. (1990). Biosensor: A Practical Approach. England : IRL Press, Oxford
- Céspedes, F., Alegret, S. 2000. New materials for electrochemical sensing II. Rigid carbon-polymer biocomposites. *Trends in analytical chemistry* 19 (4) : 276-285
- Cetinus, S.A., Oztop, N. (2000). Immobilization of catalase on chitosan film. *Enzyme and Microbial Technology*, 26 : 497–501
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2009).: www.depkes.go.id diakses Februari 2011.
- Eggins, B. R. (2002). Chemical sensors and biosensors. England : John Wiley & Sons Ltd,
- Hanafeld, U., Gardossib, L., Magnerc, E. (2009). Understanding enzyme immobilization. *Chem. Soc. Rev.*, 38 : 453–468.
- Hefian, E. E., Nasef, M. M., Yahaya, A. H. (2010). The Preparation and Characterization of Chitosan /Poly (Vinyl Alcohol) Blended Films. *E-Journal of Chemistry. E-Journal of Chemistry*, 7(4) : 1212-1219.
- Kalisz, H.M., Hecht, H.J., Schomburg, D., Schmid, R.D. (1991). Effects of carbohydrate depletion on the structure, stability and activity of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Biochim Biophys Acta*, 1080(2):138–42.
- Korell, U., Lenno, R.B. (1993). A sulphite biosensor. Coupling of sulphite oxidase (EC 1.8.3.1) to a TTFTCNQ electrode. *J. Electroanal. Chem.*, 351 : 137-143.
- Krajewska, B. (2004). Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 35 : 126–139.
- Mateo, Palomo, C. J.M., Lorente, G.F., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuente, R. (2007). Use of Chitosan Membrane from the Carapace of the Soldier Crab *Mictyris brevidactylus* for Biosensor Construction. *Enzim Microb. Technol.* 40 : 1451.
- Mehtaa, A., Zydney, A. L. (2005). Permeability and selectivity analysis for ultrafiltration membranes. *Journal of Membrane Science* 249 : 245–249
- Miao Y, Tan, S.N. (2001). Amperometric hydrogen peroxide biosensor with silica sol-gel/chitosan film as

- immobilization matrix. *Analytica Chimica Acta*, 437 : 87–93
- Nur, Adrian, Dhini, W., Febriana, Y., Setyawan, H. (2010). Immobilisasi Enzim GOD/HRP Untuk Aplikasi Biosensor Dengan Metode sol-gel. Seminar Rekayasa Kimia dan Proses. 4-5 Agustus 2010. ISSN : 1411-4216. Semarang : Universitas Diponegoro, B021.
- Osman, Z., Arof, A. K. (2003). FTIR studies of chitosan acetate based polymer electrolytes. *Electrochimica Acta*, 48 : 993-999
- Pillai, C.K.S., Paul, W., Sharma, C.P. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, 34 : 641–678.
- Sampath, Lev, S. O. (1997). 3D Organized Self-Assembled Monolayer Electrodes: A Novel Biosensor Configuration. *Adv Mater*, 9 :. 5
- Skoog, D.A, West, D.M., James, H.F. (1994). Fundamentals of Analytical Chemistry. Seventh Edition. Philadelphia: Saunders College Publishing.
- Mathias, U., Papra, P. 1997. Polyacrylonitrile enzyme ultrafiltration membranes prepared by adsorption, cross-linking, and covalent binding. *Enzyme and Microbial Technology*, 20 : 61-68.
- Wang, J. (2008). Electrochemical Glucose Biosensors. *Chem. Rev.*, 108 (2), 814
- Wu, Z., Feng, W., Feng, Y., Liu, Q., Xu, X., Sekino, T., Fuji, A., Ozaki, M. (2007). . Preparation and characterization of chitosan-grafted multiwalled carbon nanotubes and their electrochemical properties. *Carbon*, 45: 1212–1218.
- Yang, Y.M., Wang, J.W., Tan, R.X. (2004). Immobilization of glucose oxidase on chitosan–SiO₂ gel. *Enzyme and Microbial Technology*, 34 :126–131.