

**PENGARUH LAMA AMOBILISASI URIKASE PADA
PEMBUATAN BIOSENSOR POTENSIOMETRI ASAM URAT**

SKRIPSI

oleh:

RIRIN WIDYA HERINA

0410920051-92



JURUSAN KIMIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2008

**PENGARUH LAMA AMOBILISASI URIKASE PADA
PEMBUATAN BIOSENSOR POTENSIOMETRI ASAM URAT**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Kimia

oleh:

RIRIN WIDYA HERINA

0410920051-92



JURUSAN KIMIA

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2008

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**PENGARUH LAMA AMOBILISASI URIKASE PADA
PEMBUATAN BIOSENSOR POTENSIOMETRI ASAM URAT**

oleh:

RIRIN WIDYA HERINA

0410920051-92

**Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal.....**

**dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Kimia**

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. Ani Mulyasuryani, MS

NIP. 131 960 438

Drs. Sutrisno, M.Si

NIP. 131 879 407

Menyetujui,

Ketua Jurusan Kimia

Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

M. Farid Rahman, S.Si, M.Si

NIP. 132 158 726

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ririn Widya Herina

NIM : 0410920051-92

Jurusan : Kimia

Penulis skripsi berjudul :

**PENGARUH LAMA AMOBILISASI URIKASE PADA
PEMBUATAN BIOSENSOR POTENSIOMETRI ASAM
URAT**

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila di kemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 28 Januari 2008

Yang menyatakan,

(Ririn Widya Herina)

NIM. 0410920051-92

PENGARUH LAMA AMOBILISASI URIKASE PADA PEMBUATAN BIOSENSOR POTENSIOMETRI ASAM URAT

ABSTRAK

Biosensor potensiometri asam urat dapat dirancang berdasarkan pada reaksi enzimatis yang dikatalisis oleh urikase. CO_2 yang dihasilkan dalam reaksi tersebut dapat terionisasi menjadi HCO_3^- dan H_3O^+ . Konsentrasi H_3O^+ yang dihasilkan dipengaruhi oleh jumlah urikase amobil. Oleh karena itu, jumlah urikase amobil dapat mempengaruhi kinerja biosensor. Dalam penelitian ini, jumlah urikase amobil ditentukan dengan mengatur lama amobilisasi. Pada penelitian ini dipelajari pengaruh lama amobilisasi terhadap kinerja biosensor. Biosensor potensiometri asam urat dibuat dengan menggunakan elektroda sensor pH yang dilapisi urikase amobil pada membran kitosan. Kinerja biosensor yang ditentukan adalah bilangan Nernst, kisaran konsentrasi, batas deteksi, dan waktu respon yang diperoleh dari data pengukuran potensial sel larutan asam urat pada lama amobilisasi 3, 6, 9, 12, 15, dan 24 jam. Dari hasil penelitian, diketahui bahwa lama amobilisasi berpengaruh terhadap kinerja biosensor. Lama amobilisasi 3 sampai 15 jam dapat meningkatkan kinerja biosensor, sedangkan setelah 15 jam kinerja biosensor menurun. Kinerja maksimum biosensor dihasilkan pada lama amobilisasi 15 jam dengan nilai bilangan Nernst sebesar 27,87 mV/dekade. Kisaran konsentrasi biosensor antara 10 sampai 20 ppm, dengan batas deteksi 9,4 ppm, dan waktu respon 5 menit.

Kata kunci: lama amobilisasi, biosensor potensiometri, asam urat

THE EFFECT OF IMMOBILIZATION PERIOD IN THE DESIGNATION OF POTENTIOMETRIC URIC ACID BIOSENSOR

ABSTRACT

A potentiometric uric acid biosensor can be designed depending on the enzymatic reaction catalyzed by uricase. CO_2 produced in the reaction can be ionized resulting HCO_3^- and H_3O^+ ions. The concentration of H_3O^+ ion was affected by the amount of immobile uricase. Thus, the amount of immobile uricase can influence the performance of the biosensor. In this experiment, the amount of immobile uricase is controlled by timing the immobilization process. Therefore, this experiment studied the effect of immobilization period to the performances of the biosensor. Potentiometric uric acid biosensor was made of a pH-sensor electrode which was coated with immobile uricase in the chitosan membrane. The determined biosensor's performances were Nernstian factor, the range of uric acid concentration, the limit of detection, and the response time which were obtained from the cell potential (E_{cell}) data of uric acid solution of the immobilization time 3, 6, 9, 12, 15, and 24 hours. From the experiment, it was resulted that the immobilization period affects the biosensor's performance. Immobilization period of 3-15 hours increase the biosensor's performance, while after 15 hours the performance decreases. The maximum performance of the biosensor obtained when the immobilization period was 15 hours, where the Nernstian factor was 27,87 mV/decade. The range of uric acid concentration was 10-20 ppm, the limit of detection was 9,4 ppm, and the response time was 5 minutes.

Keywords: immobilization period, potentiometric biosensor, uric acid

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT, atas terselesaikannya tugas akhir dengan judul **Pengaruh Lama Amobilisasi Urikase pada Pembuatan Biosensor Potensiometri Asam Urat**. Tugas akhir ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Kimia, di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang. Penulisan tugas akhir ini tidak lepas dari dukungan dan bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Dr. Ani Mulyasuryani, MS., selaku dosen Pembimbing I dan Drs. Sutrisno, M.Si., selaku pembimbing II, yang telah banyak memberikan bimbingan, arahan dan dukungan dalam penyelesaian tugas akhir ini.
2. Dr. Diah Mardiana, MS., selaku dosen Penasehat Akademik yang telah memberikan banyak saran dan nasehat selama menjalani studi.
3. Drs. Warsito, MS.; Dr. Diah Mardiana, MS.; Darjito, S.Si, M.Si.; dan Arie Srihardyastuti, S.Si, M.Kes, selaku dosen penguji yang telah memberikan kritik dan saran dalam perbaikan tugas akhir ini.
4. M. Farid Rahman, S.Si, M.Si selaku Ketua Jurusan Kimia, serta segenap Staf Pengajar dan Karyawan Jurusan Kimia.
5. Bapak, ibu, dan adik-adikku yang selalu memberikan dorongan dan bantuan baik secara material maupun spiritual.
6. Mahasiswa Kimia Universitas Brawijaya, terutama angkatan 2004 yang senantiasa membantu dalam suka maupun duka.
7. Semua pihak yang telah membantu selama penelitian sampai terselesaikannya tugas akhir ini

Tugas akhir ini tentunya masih mempunyai banyak kekurangan. Oleh karena itu, penulis mengharapkan saran dan kritik yang membangun demi kesempurnaan tugas akhir ini. Akhirnya, semoga tugas akhir ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Malang, 28 Januari 2008

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL	
HALAMAN PENGESAHAN	
LEMBAR PERNYATAAN	i
ABSTRAK	ii
ABSTRACT	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	2
1.3 Batasan Masalah.....	2
1.4 Tujuan Penelitian.....	2
1.5 Manfaat Penelitian.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Biosensor.....	4
2.2 Biosensor Potensiometri Asam Urat.....	6
2.3 Pengukuran Potensial Sel.....	10
2.4 Kinerja Biosensor Potensiometri Asam Urat.....	12
2.5 Hipotesis.....	13
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	14
3.2 Bahan dan Alat Penelitian.....	14
3.2.1 Bahan penelitian.....	14
3.2.2 Alat penelitian.....	14
3.3 Tahapan Penelitian.....	14
3.4 Cara Kerja Penelitian.....	15
3.4.1 Pembuatan membran kitosan.....	15
3.4.2 Amobilisasi urikase pada membran kitosan.....	15
3.4.3 Perancangan biosensor asam urat.....	15
3.4.4 Pengukuran potensial sel (E_{sel}).....	15
3.4.5 Pengolahan data.....	16

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

- 4.1 Pengaruh Lama Amobilisasi terhadap Kinerja Biosensor Potensiometri Asam Urat..... 18
- 4.2 Karakter Biosensor Potensiometri Asam Urat..... 23
- 4.3 Mekanisme Kerja Biosensor Potensiometri Asam Urat.... 24

BAB V PENUTUP

- 5.1 Kesimpulan..... 26
- 5.2 Saran..... 26

DAFTAR PUSTAKA..... 27

LAMPIRAN..... 29



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Biosensor potensiometri	5
Gambar 2.2 Struktur kimia kitosan	8
Gambar 2.3 Kurva hubungan antara konsentrasi asam urat dan aktivitas urikase	8
Gambar 2.4 Reaksi oksidasi asam urat	9
Gambar 4.1 Hasil pengukuran E_{sel} larutan baku asam urat pada berbagai lama amobilisasi	19
Gambar 4.2 Kurva hubungan antara lama amobilisasi urikase dan bilangan Nernst	20
Gambar 4.3 Kurva hubungan antara $C_{asam\ urat}$ dan ΔE_{sel}	21
Gambar 4.4 Kurva waktu respon	23
Gambar 4.5 Mekanisme kerja biosensor	24
Gambar L.3.2 Kurva baku absorbansi kasein	46
Gambar L.5 Kurva penentuan bilangan Nernst	51
Gambar L.6 Grafik hubungan antara $-\log [asam\ urat]$ dan ΔE_{sel}	52

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Hasil pengukuran potensial sel larutan asam urat pada pH 9 dan lama amobilisasi 3 jam	17
Tabel 4.2 Kisaran konsentrasi untuk setiap lama amobilisasi	22
Tabel L.3.2 Absorbansi larutan baku kasein	46
Tabel L.3.3 Absorbansi urikase ($\lambda = 544,5 \text{ nm}$)	47
Tabel L.3.5 Jumlah urikase teramobilkan dan asam urat teroksidasi pada lama amobilisasi 3-24 jam	48
Tabel L.4.1.1 Data potensial sel larutan asam urat 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm pada pH 9 dan lama amobilisasi 3 jam	48
Tabel L.4.1.2 Data potensial sel larutan asam urat 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm pada pH 9 dan lama amobilisasi 6 jam	49
Tabel L.4.1.3 Data potensial sel larutan asam urat 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm pada pH 9 dan lama amobilisasi 9 jam	49
Tabel L.4.1.4 Data potensial sel larutan asam urat 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm pada pH 9 dan lama amobilisasi 12 jam	49
Tabel L.4.1.5 Data potensial sel larutan asam urat 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm pada pH 9 dan lama amobilisasi 15 jam	50
Tabel L.4.1.6 Data potensial sel larutan asam urat 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm pada pH 9 dan lama amobilisasi 24 jam	50
Tabel L.4.2 Data ΔE_{sel} larutan asam urat 5, 10, dan 15 ppm pada waktu 0 sampai 360 detik	51

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
L.1 Diagram Alir	29
L.1.1 Skema Penelitian	29
L.1.2 Pembuatan membran kitosan dan amobilisasi urikase	30
L.1.3 Pembuatan larutan buffer fosfat pH 9	32
L.1.4 Pembuatan larutan asam urat	34
L.1.5 Isolasi Urikase dari <i>Candida utilis</i>	35
L.1.6 Perancangan biosensor dan pengukuran potensial sel	40
L.1.7 Penentuan kadar protein	40
L.2 Perhitungan Pembuatan Larutan	43
L.2.1 Larutan NaOH 0,1 M	43
L.2.2 Larutan H ₃ PO ₄ 0,1 M	43
L.2.3 Larutan baku asam urat 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm	43
L.2.4 Larutan glisin 0,1 M	44
L.2.5 Larutan Na-asetat 0,2 M	44
L.2.6 Larutan buffer fosfat pH 9	44
L.3 Penentuan Kadar Protein	45
L.3.1 Perhitungan pembuatan larutan baku kasein	45
L.3.2 Kurva baku kasein	46
L.3.3 Data pengukuran absorbansi urikase	47
L.3.4 Perhitungan massa urikase amobil dan asam urat teroksidasi	47
L.3.5 Data massa urikase teramobilkan dan asam urat teroksidasi	48
L.4 Data Pengukuran Potensial Sel (E_{sel})	48
L.4.1 Data pengukuran potensial sel larutan asam urat 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm pada lama amobilisasi 3, 6, 9, 12, 15, dan 24 jam	48
L.4.2 Data pengukuran ΔE_{sel} untuk penentuan waktu respon	51
L.5 Contoh Penentuan Bilangan Nernst	51
L.6 Penentuan Kisaran Konsentrasi dan Batas Deteksi	52

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Asam urat merupakan hasil akhir proses katabolisme nukleotida purin dalam tubuh manusia. Senyawa ini mempunyai kelarutan yang kecil dalam air dan diekskresikan melalui urin. Apabila jumlahnya berlebih, akan terjadi pengendapan kristal asam urat dalam tubuh terutama pada persendian. Keadaan tersebut dikenal dengan istilah *gout*, yang bisa disebabkan oleh peningkatan produksi asam urat maupun konsumsi makanan kaya purin (Juandy, 2006). Setiap manusia sudah memiliki kadar asam urat dalam tubuh pada batas normal, yaitu 6 mg/dL untuk wanita dan 7 mg/dL untuk pria. Kadar asam urat dalam tubuh yang melebihi batas normal tersebut akan memicu timbulnya *gout* (Sujatmiko, 2005). Oleh karena itu, diperlukan suatu metode yang akurat untuk mendeteksi kadar asam urat dalam tubuh.

Kadar asam urat dapat ditentukan dengan metode spektrofotometri menggunakan 2,4,6-tribromofenol dan 4-aminoantipirin sebagai pereaksi, serta urikase sebagai katalis. Hasil reaksi diukur pada panjang gelombang 492 nm. Metode ini memiliki kisaran konsentrasinya 10-20 mg/dL, sehingga sulit digunakan untuk mendeteksi kadar asam urat normal (Kabasakalian, dkk., 1973). Selain metode spektrofotometri, biosensor potensiometri asam urat juga telah dikembangkan untuk mendeteksi kadar asam urat dalam tubuh. Pada metode ini, digunakan urikase dan katalase sebagai katalis yang diamobilkan dalam 3-glisidiloksiipropiltrimetoksisilan (GPTS). Biosensor tersebut mempunyai kinerja yang cukup baik karena kisaran konsentrasinya 2-7 mg/dL, sehingga bisa digunakan untuk mendeteksi kadar asam urat dalam konsentrasi rendah (Liao, dkk., 2006).

Mengacu pada penelitian Liao, dkk., maka dalam penelitian ini dikembangkan suatu biosensor potensiometri asam urat. Biosensor ini disusun dengan menggunakan urikase yang diamobilkan pada membran kitosan, dan kemudian dilapiskan pada elektroda sensor pH. Urikase yang digunakan dalam penelitian ini diisolasi dari *Candida utilis*. Membran kitosan telah digunakan dalam pembuatan sensor potensiometri untuk analisis kreatinin. Proses amobilisasi kreatinin iminohidrolase dilakukan melalui

perendaman, dan enzim teramobilkan secara adsorpsi (Magalhaes dan Machado, 2002).

Secara teoritis, jumlah enzim berpengaruh terhadap kecepatan reaksi pada konsentrasi substrat yang sama. Jumlah enzim dapat menentukan konsentrasi CO_2 yang terbentuk. CO_2 dihasilkan dari reaksi oksidasi asam urat, yang selanjutnya terionisasi menjadi HCO_3^- dan H_3O^+ dengan adanya air. Keberadaan ion H_3O^+ pada permukaan elektroda gelas dapat terdeteksi sebagai penurunan pH. Hal ini dapat mempengaruhi kinerja biosensor asam urat. Kinerja biosensor asam urat ditunjukkan oleh nilai bilangan Nernst, kisaran konsentrasi, batas deteksi, dan waktu respon yang dihasilkan. Jumlah urikase yang teramobilkan pada membran kitosan dapat ditentukan melalui pengaturan waktu amobilisasi, yaitu dengan mengatur lama perendaman membran dalam larutan enzim. Oleh karena lama amobilisasi urikase berpengaruh pada kinerja biosensor asam urat, maka dalam penelitian ini telah dipelajari pengaruh tersebut.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, dapat dirumuskan suatu permasalahan yaitu bagaimana pengaruh lama amobilisasi urikase terhadap kinerja biosensor potensiometri asam urat?

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini, yaitu:

1. Urikase yang digunakan diisolasi dari *Candida utilis* dan mempunyai kadar protein sebesar 2,612 mg/mL.
2. Pengukuran dilakukan pada pH larutan 9.
3. Pengukuran dilakukan pada suhu ruang.
4. Membran kitosan yang digunakan mempunyai ketebalan 10,5 μm .
5. Parameter kinerja biosensor yang diamati adalah bilangan Nernst, kisaran konsentrasi, batas deteksi, dan waktu respon.

1.4 Tujuan Penelitian

Dari perumusan masalah yang telah dikemukakan di atas, maka penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh lama

amobilisasi urikase terhadap kinerja biosensor potensimetri asam urat.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah memberikan suatu informasi mengenai salah satu variabel dalam perancangan biosensor potensimetri asam urat, yaitu lama amobilisasi urikase pada membran kitosan.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biosensor

Biosensor adalah suatu perangkat atau instrumen analitik yang menggunakan biomolekul seperti enzim, antibodi, jaringan, sel, dan mikroba untuk melakukan pengenalan atau deteksi terhadap suatu zat kimia tertentu (Pijanowska, dkk., 2005). Komponen biosensor terdiri atas (Hitt, 2005):

- *Bioreseptor*, yaitu molekul biologis yang dapat bereaksi dengan analit secara selektif. *Bioreseptor* yang sering digunakan adalah antibodi dan enzim. Pada biosensor asam urat, *bioreseptor* yang digunakan adalah urikase, yaitu jenis enzim yang selektif terhadap asam urat.
- *Transduser*, yaitu bagian dari biosensor yang dapat membaca suatu perubahan fisika maupun kimia dan mengubahnya menjadi suatu sinyal elektrik yang terukur. Ada beberapa jenis *transduser* yang sering digunakan, yaitu amperometri, konduktometri, optik, potensiometri, dan termal.

Interaksi spesifik antara analit dan *bioreseptor* seperti enzim atau antibodi akan menghasilkan suatu perubahan fisika kimia. Perubahan tersebut dapat dideteksi oleh transduser dan diubah menjadi suatu sinyal elektrik (Rao dan Mulchandani, 2005).

Biosensor elektrokimia merupakan salah satu biosensor yang perkembangannya cukup baik. Sinyal yang terukur oleh biosensor elektrokimia berupa sinyal listrik. Prinsip dasar dari biosensor elektrokimia adalah suatu reaksi kimia yang melibatkan atau menghasilkan suatu ion atau elektron yang akan mengubah sifat elektrik dari larutan. Perubahan tersebut dapat digunakan sebagai parameter pengukuran. Biosensor jenis ini dapat diklasifikasikan menjadi tiga, yaitu konduktometri, amperometri, dan potensiometri. Ketiga jenis biosensor tersebut mempunyai karakter yang berbeda dan dijelaskan sebagai berikut (Chauvan, dkk., 2004 dan Mohanty, 2001):

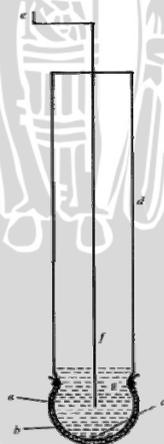
- a. Jenis konduktometri mendeteksi suatu perubahan konduktivitas atau resistensi dari larutan. Tipe ini memiliki sensitivitas yang rendah. Parameter yang digunakan adalah arus sinusoidal (AC).
- b. Jenis amperometri memiliki suatu sensitivitas yang cukup tinggi pada molekul-molekul biokimia yang elektroaktif. Parameter

yang terukur pada biosensor jenis ini adalah arus DC yang didasari oleh persamaan Cottrell.

- c. Jenis potensiometri mengukur suatu perubahan potensial oksidasi atau reduksi dari reaksi elektrokimia. Prinsipnya adalah saat elektroda yang terhubung dengan *bioresceptor* kontak dengan analit, akan terjadi perubahan potensial. Perubahan potensial ini terjadi karena adanya reaksi enzimatik yang menyebabkan perubahan aktivitas ion analit. Parameter yang terukur adalah potensial sel larutan berdasarkan persamaan Nernst.

Biosensor dapat dirancang dengan menggunakan elektroda yang dilapisi dengan suatu membran yang mengandung *bioresceptor*. Berdasarkan penelitian Magalhaes dan Machado (2002), suatu biosensor potensiometri dapat dibuat dari elektroda selektif ion amonium yang dilapisi dengan kreatinin iminohidrolase amobil pada membran kitosan. Proses amobilisasi dilakukan dengan cara perendaman, di mana enzim teramobilkan secara adsorpsi. Membran kitosan dibuat melalui pelarutan serbuk kitosan dalam larutan asam asetat dan pengadukan selama 12 jam. Selanjutnya larutan yang terbentuk dituang pada lapisan polietilen dan dibiarkan kering. Membran yang dihasilkan dipotong berbentuk lingkaran, dinetralkan, dan dicuci sebelum digunakan dalam proses amobilisasi.

Susunan dari suatu biosensor potensiometri diperlihatkan pada Gambar 2.1 (Chaplin, 2004).



Gambar 2.1 Biosensor potensiometri

Keterangan Gambar 2.1:

- a. Membran untuk amobilisasi biokatalis/*bioresceptor*
- b. Biokatalis/*bioresceptor*
- c. Membran gelas aktif
- d. Elektroda sensor pH
- e. Potensial listrik
- f. Elektroda Ag/AgCl
- g. Larutan HCl encer

Karakteristik dari biosensor yang baik, antara lain *bioresceptor* yang digunakan mempunyai spesifikasi tinggi untuk tujuan analisis dan stabil pada kondisi penyimpanan normal, respon tepat dan akurat untuk daerah konsentrasi analisis yang beragam, serta reaksi tidak tergantung pada parameter fisik yang tidak dapat dikendalikan (Chaplin, 2004).

2.2 Biosensor Potensiometri Asam Urat

Urikase (*urate–oxygen oxidoreduktase*, E.C.1.7.3.3) adalah enzim yang mengkatalisis oksidasi asam urat dengan molekul O₂ bertindak sebagai penerima elektron. Hasil reaksi enzimatik ini adalah H₂O₂, CO₂ dan allantoin (Conley dan Priest, 1979). Urikase adalah salah satu golongan oksidase yang memindahkan sepasang elektron dari substrat yaitu asam urat ke oksigen, membentuk hidrogen peroksida (Suhartono, 1989).

Sifat urikase yang dimurnikan dari *Candida sp.* menurut Jianguo, dkk., (1994) adalah sebagai berikut:

- pH optimum : 8,5
- pH optimum pada amobil : 7,5
- suhu optimum : 30⁰ C
- stabilitas termal : 45⁰ C; 5 menit
- berat molekul : 70.000-76.000
- titik isoelektrik : pH 5,6
- aktivitas spesifik enzim : 0,05-7,00 (μ/mg protein).

Teknologi amobilisasi enzim berkembang dengan disadarinya beberapa kelemahan sifat enzim, antara lain ketidakstabilan, tingginya biaya isolasi dan pemurnian, serta mahalnnya biaya penggunaan enzim karena enzim yang telah dipakai di dalam larutan sulit untuk *direct recovery*. Padahal, selama enzim

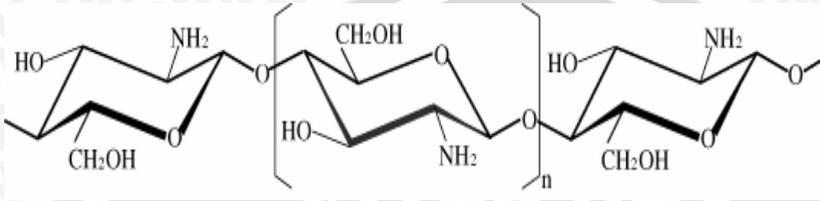
belum mengalami kerusakan struktur, enzim masih dapat dipakai berulang-kali. Dalam keadaan bebas, enzim mudah mengalami proses denaturasi terutama oleh pengaruh suhu. Proses ini menimbulkan perubahan konformasi dan penurunan aktivitas enzim. Enzim yang terdenaturasi lebih mudah mengalami perubahan kimia yang bersifat destruktif. Dasar teknologi amobilisasi adalah membuat konformasi aktif enzim tahan terhadap lingkungan. Caranya dengan mengikat molekul enzim pada suatu penyangga, membuat persilangan yang kuat di antara asam amino penyusun enzim, atau enzim dijebak sehingga tercapai struktur granula padat yang stabil. Struktur padat tersebut dapat dipakai berulang-ulang karena stabilitas yang tinggi dan enzim mudah dipisahkan dari larutan pereaksi (Suhartono, 1989).

Dalam proses amobilisasi, pengikatan enzim ke suatu pembawa (*carrier*) harus dilakukan tanpa merusak struktur ruang tiga dimensi dari sisi aktif enzim, sehingga proses pengenalan terhadap substrat tidak terganggu. Metode amobilisasi enzim dibagi menjadi 3, yaitu (Chibata, 1978):

1. metode pengikatan enzim pada pembawa yang didasarkan atas pengikatan enzim langsung pada media pembawa. Metode ini dibagi menjadi 3 jenis, yaitu adsorpsi fisik, ikatan ionik, dan ikatan kovalen,
2. metode ikatan silang yang didasarkan pada pembentukan ikatan kimia seperti pada metode ikatan kovalen, tetapi tidak menggunakan pembawa yang tidak larut,
3. metode penjebakan enzim dengan menggunakan berbagai pembawa atau membran, misalnya alginat, poliakrilamid, agar, dan karagenan. Dari berbagai pembawa tersebut yang banyak digunakan adalah alginat dan karagenan.

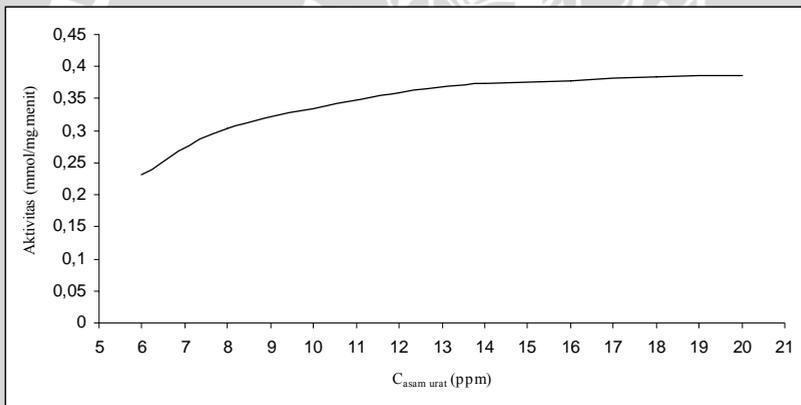
Kitosan [poli-(1→4)-β-D-glukosamin] merupakan suatu senyawa turunan dari kitin yang dapat digunakan sebagai media amobilisasi enzim. Senyawa ini terbentuk melalui proses N-deasetilasi molekul kitin (Gu, dkk., 2001). Kitosan termasuk dalam golongan polisakarida yang bersifat inert, memiliki kekuatan mekanik yang tinggi, bersifat hidrofobik, dan memiliki konduktivitas listrik $2,89 \times 10^{-4} \text{ S.cm}^{-1}$. Penggunaannya paling luas dalam bidang medis dan biosensor, karena kemampuannya untuk berikatan secara

adsorpsi fisik dengan enzim (Minteer, 2006). Struktur kimia kitosan ditampilkan pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Struktur kimia kitosan

Pada pembuatan biosensor potensiometri asam urat, kitosan memungkinkan untuk digunakan sebagai media amobilisasi urikase. Hal ini didasarkan pada sifat dan struktur kitosan yang dapat melakukan interaksi berupa adsorpsi fisik dengan enzim.



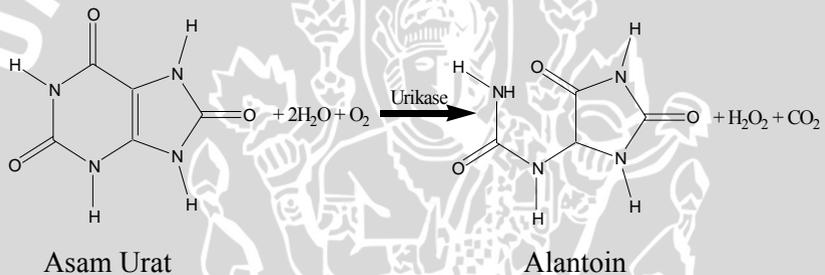
Gambar 2.3 Kurva hubungan antara konsentrasi asam urat dan aktivitas urikase

Konsentrasi asam urat dapat mempengaruhi aktivitas dan kecepatan reaksi enzimatik urikase. Pengaruh ini ditunjukkan oleh Gambar 2.3. Pada konsentrasi asam urat rendah, kecepatan reaksi oksidasi yang dikatalisis urikase juga rendah. Hal ini disebabkan oleh terbatasnya jumlah molekul urikase yang dapat mengikat molekul asam urat. Karena keterbatasan tersebut, jumlah asam urat yang teroksidasi per satuan waktu menjadi lebih sedikit atau kecepatan reaksi enzimatiknya rendah. Peningkatan konsentrasi asam urat akan

menaikkan jumlah molekul urikase yang dapat mengikat molekul asam urat, sehingga kecepatan reaksinya juga meningkat (Sa'adah, 1996).

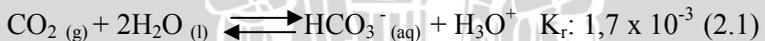
Kecepatan reaksi enzimatik urikase akan terus bertambah seiring dengan peningkatan konsentrasi asam urat, hingga tercapai kecepatan maksimum. Pada kondisi ini, semua molekul urikase telah mengikat molekul asam urat. Setelah tercapai kecepatan maksimum, penambahan jumlah asam urat tidak akan berpengaruh terhadap kecepatan reaksi enzimatik. Dari Gambar 2.3, diketahui bahwa urikase hasil isolasi dari *Candida utilis* mempunyai aktivitas maksimum sebesar 0,38 unit. Nilai ini didapatkan pada konsentrasi asam urat 16 ppm (Sa'adah, 1996).

Reaksi oksidasi asam urat yang dikatalisis oleh urikase ditunjukkan pada Gambar 2.4 (Jianguo, dkk., 1994).



Gambar 2.4 Reaksi oksidasi asam urat

Dengan adanya air, gas CO₂ akan larut menghasilkan ion HCO₃⁻ dan ion H₃O⁺ sesuai reaksi 2.1.



Mekanisme kerja biosensor asam urat didasarkan pada mekanisme kerja elektroda sensor pH. Molekul asam urat mendekat pada membran kitosan yang mengandung urikase amobil, kemudian melewati membran sehingga dapat terjadi reaksi enzimatik yang menghasilkan CO₂. Molekul CO₂ yang dihasilkan bereaksi dengan air membentuk H₂CO₃, dan terurai menjadi HCO₃⁻ dan H₃O⁺. Keberadaan ion H₃O⁺ pada permukaan elektroda gelas menyebabkan perubahan pH larutan, yang terdeteksi oleh elektrode gelas dan terukur sebagai beda potensial sel (E_{sel}).

2.3 Pengukuran Potensial Sel

Pada potensiometri, katoda merupakan elektroda indikator dan anoda merupakan elektroda pembanding. Dari permukaan larutan timbul potensial *liquid junction*, sehingga potensial sel elektrokimia (E_{sel}) diberikan oleh persamaan:

$$E_{sel} = E_{ind} - E_{ref1} + E_{ij} \quad (2.2)$$

dimana: E_{ind} = potensial setengah sel elektroda indikator
 E_{ref1} = potensial setengah sel elektroda pembanding luar
 E_{ij} = potensial *liquid junction*

Dalam elektroda gelas:

$$E_{ind} = E_b + E_{ref2} + E_{asy}$$
$$E_{ind} = 0,0592 \log a_1 - \underbrace{0,0592 \log a_2 + E_{ref2} + E_{asy}}_{\text{Konstanta (k)}} \quad (2.3)$$

dengan a_2 = konsentrasi H^+ dalam elektrode (dibuat tetap)
 a_1 = konsentrasi H^+ dalam larutan (bagian luar elektrode)
 E_{ref2} = elektrode pembanding dalam (tetap)
 E_{asy} = potensial asimetri (tetap)

Jika $(-\log a_1) = \text{pH}$ larutan, maka persamaan (2.3) dapat dituliskan:

$$E_{ind} = k - 0,0592 \text{ pH} \quad (2.4)$$

Substitusi persamaan (2.4) ke persamaan (2.2), didapatkan:

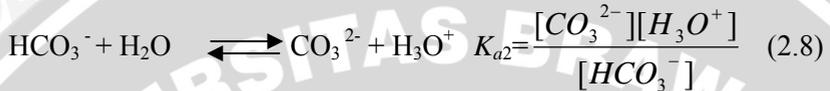
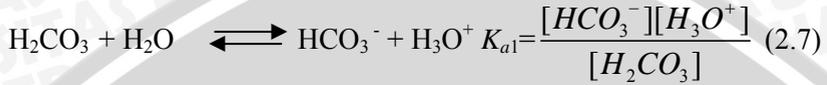
$$E_{sel} = \underbrace{k - E_{ref1}}_K + E_{ij} + 0,0592 \text{ pH} \quad (2.5)$$

Konstanta (K)

$$E_{sel} = K - 0,0592 \text{ pH} \quad (2.6)$$

Pada reaksi oksidasi asam urat yang dikatalisis oleh urikase, dihasilkan CO_2 yang jumlahnya setara dengan kadar asam urat. CO_2 dalam larutan akan menghasilkan H_2CO_3 yang mengalami ionisasi membentuk ion H_3O^+ sehingga terjadi perubahan pH larutan. Oleh

karena itu, sensor yang digunakan adalah sensor pH dengan menggunakan elektrode gelas yang dilapisi oleh enzim urikase amobil. Reaksi ionisasi asam karbonat ditunjukkan oleh persamaan 2.7 dan 2.8.



Nilai dari $K_{a1} = 1,66 \times 10^{-6}$ dan $K_{a2} = 2,51 \times 10^{-11}$. Berdasarkan nilai tersebut dapat diketahui bahwa nilai K_{a1} jauh lebih besar daripada nilai K_{a2} , sehingga kemungkinan terjadinya reaksi kedua sangat kecil dan nilai K_{a2} dapat diabaikan terhadap nilai K_{a1} .

Berdasarkan persamaan 2.7 didapatkan:

$$K_{a1} = \frac{[\text{HCO}_3^-][\text{H}_3\text{O}^+]}{C_{\text{H}_2\text{CO}_3} - [\text{H}_3\text{O}^+]} = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+]^2}{C_{\text{H}_2\text{CO}_3} - [\text{H}_3\text{O}^+]} \quad (2.9)$$

$$K_{a1} \cdot C_{\text{H}_2\text{CO}_3} - K_{a1}[\text{H}_3\text{O}^+] = [\text{H}_3\text{O}^+]^2$$

$$[\text{H}_3\text{O}^+]^2 + K_{a1}[\text{H}_3\text{O}^+] - K_{a1}C_{\text{H}_2\text{CO}_3} = 0$$

$$[\text{H}_3\text{O}^+] = \frac{-K_{a1} + \sqrt{K_{a1}^2 + 4K_{a1}C_{\text{H}_2\text{CO}_3}}}{2}$$

$$[\text{H}_3\text{O}^+] = \sqrt{K_{a1}C_{\text{H}_2\text{CO}_3}} \quad (2.10)$$

dimana $C_{\text{H}_2\text{CO}_3}$ adalah konsentrasi awal H_2CO_3 yang sebanding dengan konsentrasi asam urat maka:

$$[\text{H}_3\text{O}^+] = \sqrt{K_{a1}C_{\text{asam - urat}}} \quad (2.11)$$

Persamaan 2.11 dimasukkan ke dalam persamaan 2.6 pada elektroda gelas, sehingga didapatkan persamaan:

$$E_{\text{sel}} = K + 0,0592 \log [\text{H}_3\text{O}^+] \quad (2.12)$$

$$= K + 0,0592 \log \sqrt{K_{a1}C_{\text{asam - urat}}}$$

$$= K + \underbrace{\left(\frac{0,0592}{2} \log K_{a1} + \frac{0,0592}{2} \log C_{\text{asam-urat}} \right)}_{K'}$$

$$\begin{aligned} E_{\text{sel}} &= K' + 0,0296 \log C_{\text{asam-urat}} \\ &= K' - 0,0296 \text{ pAsam urat} \end{aligned} \quad (2.13)$$

2.4 Kinerja Biosensor Potensiometri Asam Urat

Kinerja biosensor ini ditentukan oleh beberapa parameter, antara lain bilangan Nernst, kisaran konsentrasi, batas deteksi, dan waktu respon biosensor.

Bilangan Nernst menunjukkan kepekaan dari suatu elektroda terhadap ion tertentu pada daerah konsentrasi pengukuran. Bilangan Nernst dapat diperoleh dengan membuat kurva hubungan antara perubahan potensial sel (ΔE_{sel}) sebagai sumbu y dan $-\log$ [asam urat] sebagai sumbu x. Besarnya kemiringan garis pada kurva tersebut menunjukkan nilai bilangan Nernst. Secara teori harga bilangan Nernst adalah $2,303 \text{ RT/nF}$. Dengan memasukkan harga $R = 0,082 \text{ atm.L.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$; $F = 96500 \text{ C}$; dan $T = 298,15 \text{ K}$ maka diperoleh bilangan Nernst dari ion monovalen sebesar $59,2 \text{ mV/dekade}$ (Turner, dkk., 1987). Bilangan Nernst berfungsi untuk mengetahui kinerja dari biosensor asam urat yang dirancang. Berdasarkan perhitungan akan didapatkan harga bilangan Nernst biosensor potensiometri asam urat sebesar $29,6 \text{ mV/dekade}$.

Kisaran konsentrasi adalah batas konsentrasi di mana kurva hubungan antara potensial sel (E_{sel}) dan $-\log$ [analit] masih memberikan garis lurus dan memenuhi persamaan Nernst (Wroblewski, 2005). Dari kurva hubungan antara potensial sel (E_{sel}) dan $-\log$ [asam urat], diperoleh suatu daerah linier dan nonlinier. Kisaran konsentrasi elektroda adalah rentang konsentrasi yang masih berada pada daerah linier. Akan tetapi, setiap elektroda mempunyai kepekaan yang berbeda. Pada konsentrasi tertentu, tidak semua elektroda dapat memberikan perubahan potensial. Dengan demikian, perlu diketahui kisaran konsentrasi yang secara kuantitatif dapat memberikan perubahan potensial yang cukup berarti terhadap perubahan konsentrasi ion dalam larutan (Turner, dkk., 1987).

Batas deteksi merupakan batas konsentrasi terendah dari respon *Nernstian* elektroda yang diperoleh dari perpotongan garis singgung antara garis linier dengan garis melengkung kurva hubungan E_{sel} (mV) dengan $-\log$ konsentrasi analit. Perpotongan kedua garis singgung tersebut diekstrapolasikan pada sumbu x, sehingga diperoleh konsentrasi dari batas deteksi (Evans, 2000).

Waktu respon merupakan waktu yang diperlukan elektroda untuk memperoleh potensial sel yang bernilai tetap (stabil). Potensial sel yang tetap menunjukkan reaksi kesetimbangan redoks telah tercapai. Semakin cepat suatu elektroda memberikan potensial tetap, semakin baik elektroda tersebut. Waktu respon dapat ditentukan dengan mencatat potensial sel pada setiap satuan waktu, hingga diperoleh harga tetap (Evans, 2000).

Jumlah urikase amobil akan mempengaruhi kinerja biosensor potensiometri asam urat, yang terdiri atas bilangan Nernst, kisaran konsentrasi, batas deteksi, dan waktu respon. Pengaturan jumlah urikase amobil dapat dilakukan dengan penentuan lama amobilisasi. Peningkatan lama amobilisasi diharapkan dapat meningkatkan jumlah urikase amobil dan kinerja biosensor.

2.5 Hipotesis

Berdasarkan tinjauan di atas, dapat dikemukakan suatu hipotesis bahwa peningkatan lama amobilisasi dapat menambah jumlah enzim yang teramobilkan pada membran kitosan, sehingga berpengaruh terhadap kinerja biosensor potensiometri asam urat.

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Analitik dan Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang, pada bulan Juni sampai September 2007.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah asam fosfat (H_3PO_4) pekat, natrium hidroksida (NaOH), asam asetat (CH_3COOH) glasial, kitosan, asam urat ($\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$), yeast ekstrak, glukosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), kalium dihidrofosfat (KH_2PO_4), ammonium klorida (NH_4Cl), natrium hidrofosfat heptahidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), magnesium sulfat pentahidrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), kalsium klorida dihidrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), seng sulfat heptahidrat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), besi (III) klorida heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), glisin, natrium asetat (CH_3COONa), dan aquades (H_2O), urikase yang diisolasi dari *Candida utilis* dengan kadar protein 2,612 mg/mL (pada lampiran L.1.5).

3.2.2 Alat penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah pH-meter Schoot-Gerate tipe CG.820, neraca analitik Mettler tipe AE 50, pengaduk magnetik IKAMAG RH, elektroda gelas kombinasi, inkubator Heraeus tipe B.5042, *autoclave* All American model No 25X, spektrofotometer UV-VIS Shimadzu 1601, sentrifuse dingin, serta peralatan gelas lain.

3.3 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahapan, meliputi :

1. Pembuatan membran kitosan
2. Amobilisasi urikase pada membran kitosan
3. Perancangan biosensor asam urat
4. Pengukuran potensial sel (E_{sel})

5. Pengolahan data.

3.4 Cara Kerja Penelitian

3.4.1 Pembuatan membran kitosan

Ditimbang 1,5 gram kitosan dan dilarutkan dengan 100 mL asam asetat 0,8% $\frac{v}{v}$ dalam gelas kimia 250 mL. Campuran tersebut diaduk selama satu malam dengan menggunakan pengaduk magnetik. Larutan kitosan yang terbentuk dituang di atas kaca yang telah dilapisi dengan *aluminium foil* dan setiap tepinya diberi selotip setebal 3 mm. Lapisan tersebut dikeringanginkan selama satu malam pada temperatur kamar. Membran kitosan yang telah terbentuk dipotong melingkar dengan diameter 41 mm, dinetralkan dengan larutan NaOH 1% selama 30 menit, dan dicuci dengan akuades. Sebelum digunakan, membran disimpan dalam air.

3.4.2 Amobilisasi urikase pada membran kitosan

Membran kitosan dicelupkan dalam larutan asam asetat pH 4 dan dicuci dengan akuades. Kemudian membran tersebut direndam dalam 5 mL larutan urikase pada gelas kimia 50 mL. Perendaman dilakukan dengan waktu 3, 6, 9, 12, 15, dan 24 jam.

3.4.3 Perancangan biosensor asam urat

Membran hasil amobilisasi dari tahap 3.4.2 ditempelkan pada permukaan elektroda gelas yang telah dikalibrasi menggunakan buffer pH 7 dan 10. Membran diikat dengan baik sehingga tidak termasuk oleh larutan analit. Biosensor dicelupkan dalam larutan buffer fosfat pH 9 sampai didapatkan nilai E_{sel} yang tetap.

3.4.4 Pengukuran potensial sel (E_{sel})

Pengukuran E_{sel} dilakukan pada larutan asam urat dengan konsentrasi 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm. Volume larutan asam urat yang digunakan sebanyak 25 mL. Potensial sel diukur dengan menggunakan koreksi. Pengukuran dilakukan untuk larutan asam urat pada pH 9 menggunakan elektroda gelas. Kemudian pengukuran diulangi dengan menggunakan biosensor untuk semua membran dengan lama amobilisasi 3, 6, 9, 12, 15 dan 24 jam. Pengadukan

dilakukan pada semua pengukuran dan pembacaan potensial sel dilakukan setiap 5 menit. Untuk menentukan waktu respon, pengukuran potensial sel dilakukan pada larutan asam urat dengan konsentrasi 5, 10, dan 15 ppm disertai pengadukan. Potensial sel dicatat setiap 30 detik selama 6 menit.

3.4.5 Pengolahan Data

Dihitung nilai ΔE_{sel} untuk setiap konsentrasi asam urat pada semua lama amobilisasi. Nilai ΔE_{sel} didapatkan dengan cara mengurangkan nilai E_{sel} dengan urikase dan E_{sel} tanpa urikase. Selanjutnya, dibuat kurva hubungan antara $-\log [\text{asam urat}]$ sebagai sumbu x dan ΔE_{sel} sebagai sumbu y pada setiap lama amobilisasi. Dari kurva tersebut, ditentukan nilai bilangan Nernst, kisaran konsentrasi, dan batas deteksi. Dalam penentuan waktu respon, dibuat kurva hubungan antara waktu dan ΔE_{sel} . Kemudian, ditentukan waktu di mana ΔE_{sel} pada ketiga konsentrasi yang digunakan mencapai nilai yang tetap.



BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini dilakukan penyusunan biosensor asam urat berbasis pH. Elektroda sensor pH yang bekerja secara potensiometri digunakan sebagai *transduser*. Pada permukaan elektroda, dilapiskan urikase yang diamobilkan pada membran kitosan. Urikase yang digunakan dalam penelitian ini diisolasi dari *Candida utilis* dan mempunyai kadar protein sebesar 2,612 mg/mL. Amobilisasi urikase dilakukan dengan cara merendam membran kitosan dalam larutan urikase pada pH 8. Proses amobilisasi berlangsung secara adsorpsi (Magalhaes dan Machado, 2002). Pengukuran dilakukan terhadap larutan asam urat dengan konsentrasi 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm. Adanya reaksi enzimatik menyebabkan perubahan pH larutan, yang dapat direspon oleh elektroda gelas dan diubah menjadi nilai potensial sel (E_{sel}). Untuk melihat kinerja urikase amobil, pengukuran dilakukan dengan menggunakan koreksi. Potensial sel hasil pengukuran dengan urikase amobil dikurangi hasil pengukuran tanpa urikase amobil, dan didapatkan ΔE_{sel} .

Tabel 4.1 Hasil pengukuran potensial sel larutan asam urat pada pH 9 dan lama amobilisasi 3 jam

$C_{asam\ urat}$ (ppm)	$-\log$ [asam urat]	E_{sel} tanpa urikase amobil (mV)	E_{sel} dengan urikase amobil (mV)	ΔE_{sel} (mV)
5	4,53	-85	-70	15
10	4,23	-88	-76	12
15	4,05	-88	-78	10
20	3,92	-87	-80	7
25	3,83	-85	-79	6

Dari Tabel 4.1, dapat diketahui adanya perbedaan nilai potensial sel larutan yang diukur tanpa menggunakan urikase amobil dan dengan menggunakan urikase amobil. Nilai E_{sel} yang didapatkan pada pengukuran tanpa urikase lebih kecil dibandingkan nilai E_{sel} pada pengukuran dengan urikase untuk setiap konsentrasi asam urat. Hal ini membuktikan terjadinya peningkatan jumlah ion H_3O^+ setelah terjadi reaksi enzimatik, yang dapat menyebabkan penurunan pH. Berdasarkan persamaan 2.6, penurunan pH akan meningkatkan

nilai E_{sel} . Peningkatan nilai E_{sel} itu membuktikan terjadinya reaksi enzimatik yang dikatalisis oleh urikase.

Nilai ΔE_{sel} mengalami penurunan dengan meningkatnya konsentrasi asam urat. Secara teoritis, semakin besar konsentrasi analit maka kesetimbangan reaksi akan lebih cepat tercapai. Pada konsentrasi asam urat besar, jumlah ion H_3O^+ yang terbentuk di bagian dalam membran lebih besar. Ion H_3O^+ tersebut mengalami kesetimbangan dengan ion H_3O^+ yang terdapat di bagian luar membran (di dalam larutan asam urat). Hal ini menyebabkan perbedaan jumlah ion H_3O^+ di bagian dalam dan luar membran menjadi kecil, sehingga ΔE_{sel} bernilai kecil. Sebaliknya, pada konsentrasi asam urat kecil, jumlah ion H_3O^+ yang terbentuk lebih sedikit. Oleh karena itu, kesetimbangan antara ion H_3O^+ di dalam dan di luar membran lebih lama tercapai. Perbedaan jumlah ion H_3O^+ menjadi lebih besar dan ΔE_{sel} juga lebih besar.

Peningkatan nilai E_{sel} pada pengukuran dengan menggunakan urikase amobil membuktikan terjadinya reaksi enzimatik yang dikatalisis oleh urikase. Nilai ΔE_{sel} mempunyai hubungan yang terbalik dengan konsentrasi asam urat. Membran kitosan dapat digunakan sebagai media amobilisasi urikase. Cara amobilisasi melalui perendaman dapat diterapkan dalam pembuatan biosensor potensiometri asam urat.

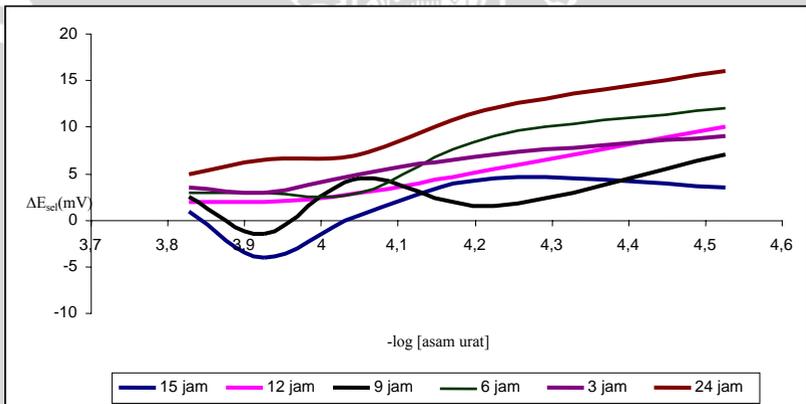
4.1 Pengaruh Lama Amobilisasi terhadap Kinerja Biosensor Potensiometri Asam Urat

Salah satu faktor yang berpengaruh terhadap jumlah CO_2 yang dihasilkan dalam reaksi oksidasi adalah konsentrasi urikase amobil. Secara teori, konsentrasi urikase akan meningkatkan kecepatan reaksi oksidasi asam urat. Pada penelitian ini, pengamatan dilakukan pada waktu yang sama, yaitu 5 menit, sehingga dengan kecepatan yang berbeda dan waktu pengamatan yang sama akan dihasilkan jumlah CO_2 yang berbeda. Hal tersebut mengakibatkan perbedaan harga potensial sel (E_{sel}) yang terbaca dan mempengaruhi kinerja biosensor.

Pada tahapan ini dilakukan pengaturan lama amobilisasi dengan waktu perendaman 3, 6, 9, 12, 15, dan 24 jam. Membran untuk amobilisasi mempunyai ketebalan 10,5 μm , urikase yang digunakan memiliki kadar protein sebesar 2,612 mg/mL sebanyak 5

mL. Hasil penelitian untuk setiap lama amobilisasi ditampilkan pada Gambar 4.1.

Setiap lama amobilisasi menghasilkan bentuk kurva yang berbeda. Dari kurva-kurva tersebut dapat diperoleh daerah linier yang berbeda-beda pula. Hal ini menunjukkan bahwa lama amobilisasi yang berbeda dapat mempengaruhi daerah konsentrasi asam urat yang mempunyai hubungan linier dengan perbedaan potensial sel (ΔE_{sel}). Pada sebagian besar kurva, daerah konsentrasi asam urat yang masih mempunyai hubungan linier dengan ΔE_{sel} berada dalam kisaran 5 sampai 15 ppm. Berdasarkan data pada Gambar 4.1, dapat ditentukan harga bilangan Nernst, kisaran konsentrasi, dan batas deteksi yang merupakan parameter kinerja biosensor. Penentuan ketiga parameter tersebut tercantum pada lampiran L.5 dan L.6.

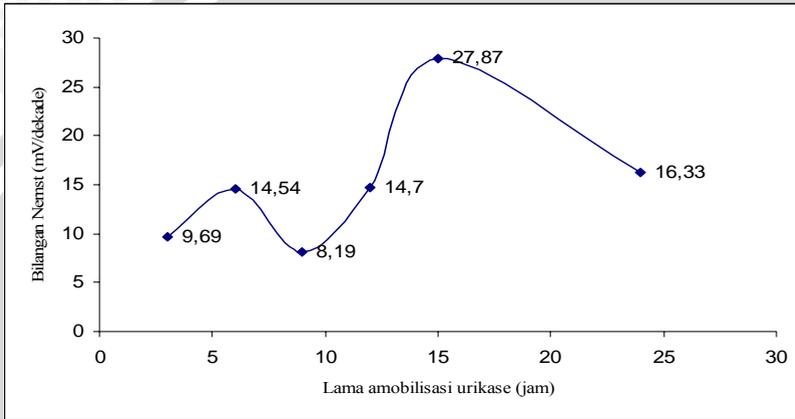


Gambar 4.1 Hasil pengukuran E_{sel} larutan baku asam urat pada berbagai lama amobilisasi

Gambar 4.1 menunjukkan adanya sedikit keteraturan bentuk kurva pada berbagai lama amobilisasi. Kurva-kurva yang didapatkan memiliki profil yang sama. Namun, hubungan antara $-\log [\text{asam urat}]$ dan ΔE_{sel} mempunyai kemiringan yang berbeda. Perbedaan tersebut disebabkan oleh berbedanya jumlah urikase amobil. Hal ini menyebabkan perbedaan nilai bilangan Nernst, kisaran konsentrasi, dan batas deteksi pada setiap lama amobilisasi. Jumlah urikase amobil terbesar diperoleh pada lama amobilisasi 24 jam, yaitu 5,95 mg. Secara umum, tidak ada pengaruh lama amobilisasi terhadap

ΔE_{sel} pada berbagai konsentrasi asam urat. Tetapi, terdapat pengecualian pada lama amobilisasi 9 dan 15 jam yang menunjukkan bentuk kurva berbeda dari kurva-kurva lainnya.

Lama amobilisasi akan mempengaruhi harga bilangan Nernst seperti terlihat pada Gambar 4.2.



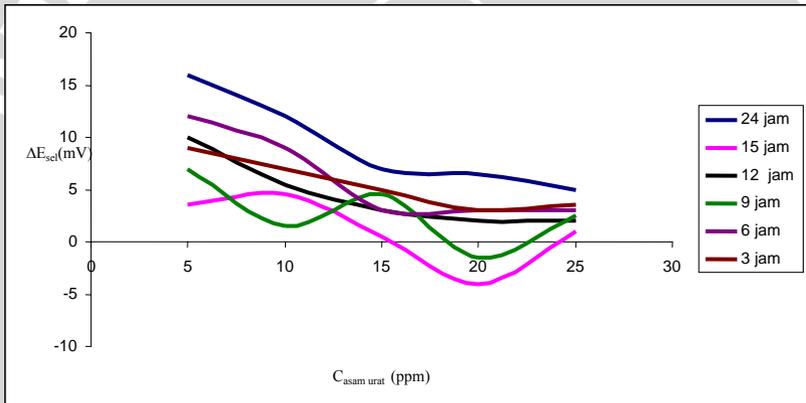
Gambar 4.2 Kurva hubungan antara lama amobilisasi urikase dan bilangan Nernst

Nilai bilangan Nernst pada lama amobilisasi 3, 6, 9, dan 12 jam berturut-turut sebesar 9,69; 14,54; 8,19 dan 14,7 mV/dekade. Pada rentang lama amobilisasi tersebut terjadi peningkatan bilangan Nernst yang cukup kecil, yaitu 5,01 mV/dekade. Padahal, jika ditinjau dari jumlah enzim yang teramobilkan, terjadi peningkatan yang cukup tinggi, sebesar 1,13 mg. Bilangan Nernst meningkat tajam pada lama amobilisasi 12 hingga 15 jam, dari 14,7 sampai 27,87 mV/dekade. Namun, peningkatan tersebut tidak disebabkan oleh bertambahnya jumlah urikase amobil. Hal ini dibuktikan oleh kecilnya perbedaan massa urikase amobil pada lama amobilisasi 12 dan 15 jam yang hanya mempunyai selisih 0,05 mg.

Nilai bilangan Nernst terbesar diperoleh pada lama amobilisasi 15 jam. Bilangan Nernst didapatkan dengan nilai 27,87 mV/dekade. Nilai ini paling dekat dengan bilangan Nernst teoritis (29,6 mV/dekade) dibandingkan nilai yang diperoleh pada lama amobilisasi lainnya. Hal tersebut menunjukkan bahwa lama amobilisasi optimum dicapai pada 15 jam. Dengan lama amobilisasi 15 jam, jumlah urikase yang teradsorpsi cukup banyak untuk

mengkatalisis reaksi oksidasi asam urat yang terdapat dalam larutan. Namun, jumlah tersebut masih memberi kemungkinan bagi molekul asam urat untuk melalui pori membran kitosan. Massa asam urat yang dapat teroksidasi pada lama amobilisasi 15 jam sebesar 1,50 mg.

Setelah 15 jam, nilai bilangan Nernst yang didapatkan lebih kecil, yaitu 16,33 mV/dekade untuk lama amobilisasi 24 jam. Pada kondisi ini, membran terlalu jenuh oleh molekul urikase. Hal tersebut berpengaruh terhadap jumlah asam urat yang dapat melewati membran. Keadaan membran yang jenuh oleh molekul urikase menyebabkan tidak adanya pori-pori yang dapat dilewati molekul asam urat. Oleh karena itu, jumlah asam urat yang dapat teroksidasi menjadi lebih sedikit dan nilai bilangan Nernst lebih kecil.



Gambar 4.3 Kurva hubungan antara $C_{\text{asam urat}}$ dan ΔE_{sel}

Gambar 4.3 memperlihatkan bahwa lama amobilisasi dapat mempengaruhi daerah konsentrasi yang mempunyai hubungan linier dengan ΔE_{sel} . Hal ini berarti bahwa setiap kurva memiliki kisaran konsentrasi dan batas deteksi yang berbeda, tergantung pada hasil pengukuran ΔE_{sel} . Nilai kisaran konsentrasi dari semua kurva ditampilkan pada Tabel 4.2. Kisaran konsentrasi dan batas deteksi merupakan parameter kinerja biosensor asam urat. Dalam penelitian ini, sebagian besar nilai batas deteksi tidak dapat ditentukan. Hal ini disebabkan oleh adanya hubungan linier antara $-\log$ konsentrasi asam urat dengan harga ΔE_{sel} pada konsentrasi lebih kecil dari 5 ppm, tetapi tidak dilakukan pengukuran E_{sel} pada konsentrasi asam urat di bawah 5 ppm.

Kurva-kurva pada Gambar 4.3 memperlihatkan bahwa pencapaian kecepatan maksimum reaksi enzimatis berbeda untuk berbagai lama amobilisasi. Tercapainya kecepatan maksimum tergantung pada jumlah enzim yang teramobilkan dengan stabil pada membran kitosan. Kestabilan dan jumlah enzim amobil dipengaruhi oleh lama amobilisasi. Perbedaan dalam pencapaian kecepatan maksimum menentukan konsentrasi asam urat yang masih mempunyai hubungan proporsional dengan ΔE_{sel} . Hal ini menunjukkan bahwa lama amobilisasi mempunyai pengaruh terhadap kisaran konsentrasi biosensor asam urat.

Tabel 4.2 Kisaran konsentrasi untuk setiap lama amobilisasi

Lama amobilisasi (jam)	Kisaran konsentrasi (ppm)
3	5-20
6	5-15
9	5-10
12	5-15
15	10-20
24	5-15

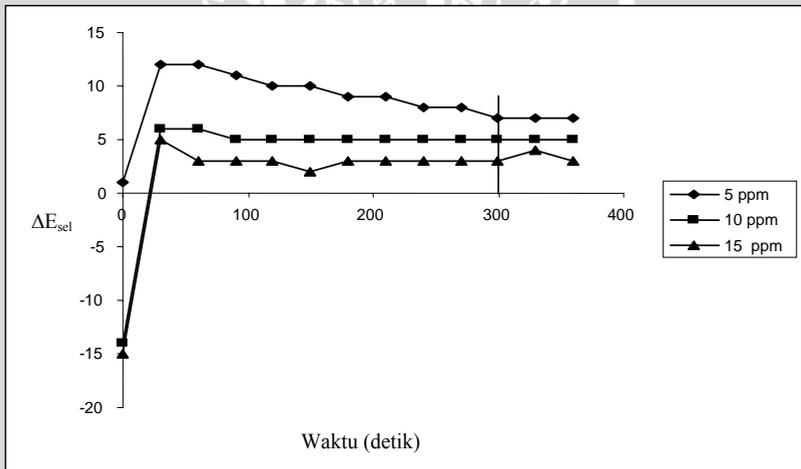
Berdasarkan Tabel 4.3, dapat dikatakan bahwa lama amobilisasi optimum adalah 3 jam karena mempunyai kisaran konsentrasi paling lebar (5-20 ppm). Nilai-nilai tersebut berarti bahwa biosensor asam urat dapat mendeteksi kadar asam urat dengan baik pada kisaran konsentrasi 5 sampai 20 ppm apabila dilakukan amobilisasi selama 3 jam. Namun, bukan hanya kisaran konsentrasi dan batas deteksi yang merupakan parameter kinerja biosensor dan ukuran untuk menentukan lama amobilisasi optimum. Dalam penelitian ini, parameter utama dalam penentuan lama amobilisasi optimum adalah nilai bilangan Nernst karena perbedaan nilai bilangan Nernst jauh lebih signifikan untuk setiap lama amobilisasi dibandingkan perbedaan kisaran konsentrasi.

Lama amobilisasi mempunyai pengaruh terhadap kinerja biosensor asam urat, yang berupa bilangan Nernst, kisaran konsentrasi, dan batas deteksi. Berdasarkan nilai bilangan Nernst, lama amobilisasi optimum diperoleh pada 15 jam. Bilangan Nernst yang didapatkan sebesar 27,87 mV/dekade, dengan kisaran

konsentrasi 10-20 ppm dan batas deteksi 9,4 ppm. Agar hasil penelitian dapat diaplikasikan, perlu diketahui lebih lanjut karakter biosensor hasil perancangan.

4.2 Karakter Biosensor Potensiometri Asam Urat

Suatu biosensor yang baik mempunyai beberapa kriteria, antara lain memiliki bilangan Nernst yang sesuai dengan nilai teoritis, kisaran konsentrasi yang lebar, batas deteksi yang rendah, dan waktu respon yang kecil. Pada hasil penelitian pengaruh lama amobilisasi telah diketahui nilai bilangan Nernst, kisaran konsentrasi, dan batas deteksi biosensor sehingga perlu ditentukan waktu respon dari biosensor. Penentuan waktu respon ini dilakukan pada konsentrasi asam urat 5, 10, dan 15 ppm. Pemilihan konsentrasi tersebut didasarkan pada Gambar 2.3, di mana kecepatan maksimum belum tercapai pada kisaran konsentrasi di bawah 16 ppm.



Gambar 4.4 Kurva waktu respon

Harga ΔE_{sel} yang tetap dicapai dalam waktu yang berbeda untuk konsentrasi asam urat yang diuji. Waktu yang diperlukan untuk mencapai harga ΔE_{sel} yang tetap semakin lama untuk konsentrasi asam urat 5 ppm. Sebaliknya, untuk konsentrasi asam urat 10 dan 15 ppm waktu yang dibutuhkan lebih cepat. Pada konsentrasi 5 ppm, dibutuhkan waktu 300 detik untuk mencapai potensial yang konstan, sedangkan waktu yang diperlukan pada

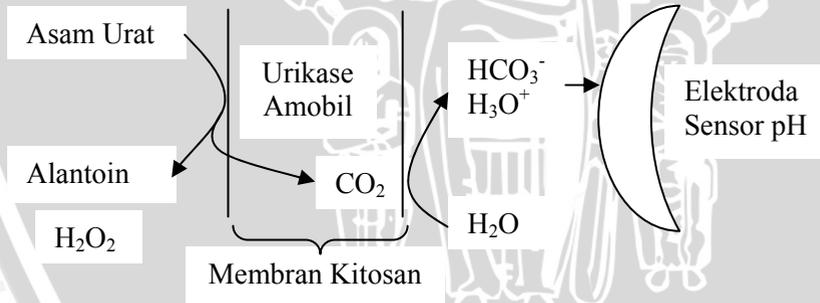
konsentrasi 10 dan 15 ppm berturut-turut sebesar 90 dan 180 detik. Berdasarkan kurva Michaelis-Menten, semakin besar konsentrasi asam urat maka kecepatan reaksi akan meningkat. Dengan adanya perbedaan kecepatan reaksi, pencapaian potensial kesetimbangan juga tidak sama. Dari Gambar 4.4, dapat diketahui bahwa waktu respon dari biosensor asam urat adalah 300 detik atau 5 menit.

4.3 Mekanisme Kerja Biosensor Potensiometri Asam Urat

Mekanisme kerja biosensor potensiometri asam urat yang telah dirancang dapat dirumuskan dari hasil penelitian. Perumusan ini didasarkan pada 2 hal, yaitu:

1. adanya peningkatan nilai E_{sel} apabila dilakukan pengukuran dengan menggunakan urikase amobil. Hal ini menunjukkan bertambahnya jumlah ion H_3O^+ pada permukaan elektroda sensor pH
2. apabila jumlah enzim yang teramobilkan terlalu banyak, bilangan Nernst mengalami penurunan yang menunjukkan bahwa molekul asam urat tidak dapat melewati pori membran kotisan.

Berdasarkan kedua hal tersebut, mekanisme kerja biosensor diperkirakan seperti pada Gambar 4.5.



Gambar 4.5 Mekanisme kerja biosensor

Kemungkinan mekanisme kerja biosensor diawali dengan proses difusi molekul asam urat ke dalam membran kitosan yang mengandung urikase amobil. Selama proses difusi tersebut, molekul asam urat mengalami reaksi oksidasi karena terjadi kontak dengan molekul urikase. Molekul CO_2 hasil reaksi larut dalam air, dan

menghasilkan ion-ion H_3O^+ serta HCO_3^- . Molekul-molekul alantoin dan H_2O_2 yang juga dihasilkan pada reaksi oksidasi asam urat keluar dari membran menuju ke dalam larutan. Keberadaan ion H_3O^+ pada permukaan elektroda gelas menyebabkan terjadinya perubahan pH. Perubahan pH tersebut dapat direspon oleh elektroda gelas dan diperoleh keluaran yang berupa potensial sel.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



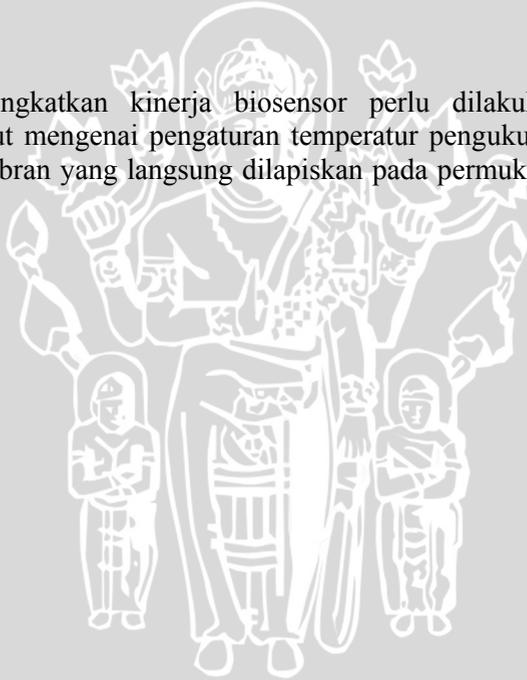
BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kinerja biosensor potensiometri asam urat yang tersusun atas elektroda sensor pH dan urikase amobil dipengaruhi oleh lama amobilisasi pada membran kitosan. Lama amobilisasi 3 sampai 15 jam dapat meningkatkan kinerja biosensor, sedangkan setelah 15 jam kinerja biosensor menurun. Kinerja maksimum biosensor dihasilkan pada lama amobilisasi 15 jam, dengan nilai bilangan Nernst sebesar 27,87 mV/dekade, kisaran konsentrasi 10 sampai 20 ppm dan waktu respon 5 menit.

5.2 Saran

Untuk meningkatkan kinerja biosensor perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaturan temperatur pengukuran dan pembuatan membran yang langsung dilapiskan pada permukaan elektroda sensor pH.



DAFTAR PUSTAKA

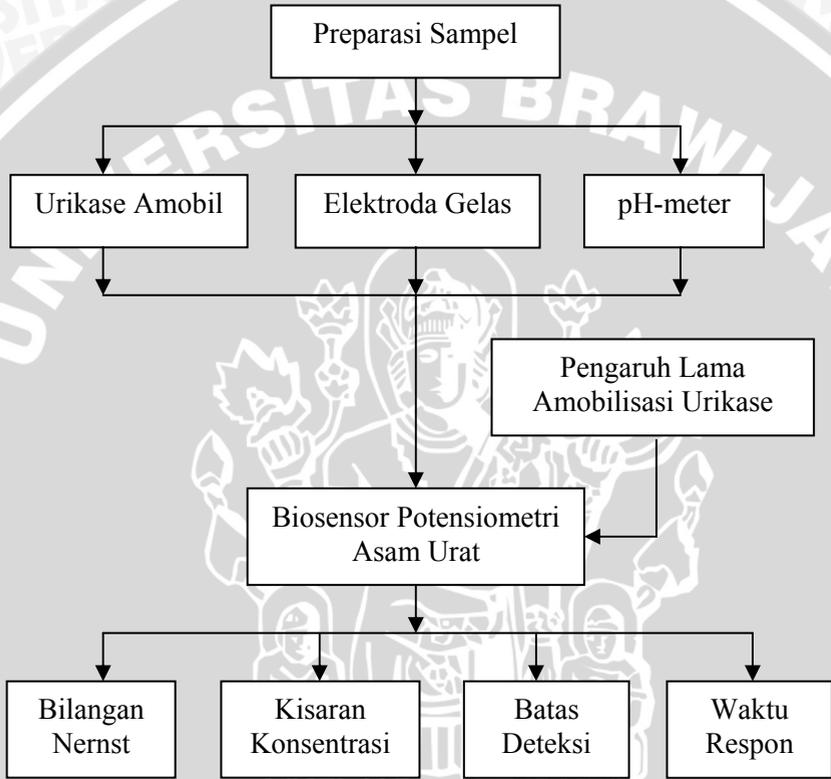
- Chaplin, M., 2004, Potentiometric Biosensors, Faculty of Engineering, Science and The Built Environment, South Bank University, London, 626-627
- Chauvan, S., V. Rai, dan H.B. Singh, 2004, Biosensors, Resonance Magz, Desember 2004, 33-44
- Chibata, I., 1978, **Immobilized Enzyme**, John Wiley and Sons, New York, 89-90
- Conley, T.G., and D.G. Priest, 1979, *J.of Biochem.*, 187, 307-310
- Evans, A., 2000, **Potentiometry and Ion Selective Electrodes**, John Wiley and Sons, New York, 61-69; 198-209
- Gu, Z.Y., P.H. Xue, and W.J. Li, 2001, Preparation of The Porous Chitosan Membrane by Cryogenic Induced Phase Separation, *Polym. Adv. Technol.*, 12, 665-669
- Hitt, E., 2005, Label-Free, Optical, Acoustic, and Calorimetric Analytical Methods do not Alter the Protein of Interest, but They have Complications of Their Own Diagram of Typical Biosensor Mechanisms, *Drug Disc. Development.*, 24-29 <http://www.dddmag.com>, tanggal akses: 21 Agustus 2005
- Jianguo, L., L. Gaoxiang, L. Hong, and Z. Xiukai, 1994, Purification and Properties of Uricase from *Candida utilis* and Its Application in Uric Acid Analysis in serum, *J. App. Biochem. and Biotech.*, 147, 53-63
- Juandy, 2006, Gout dan Diet, <http://www.depkes.go.id>, tanggal akses: 15 Maret 2007, 1-2
- Kabasakalian, P., S. Kalliney, and A. Westcott, 1973, Determination of uric Acid in Serum with Use of Uricase and A Tribromophenol-Aminoantipyrine Chromogen, *Clin. Chem.*, 19, 522-524, tanggal akses: 19 Juni 2007
- Liao, C., J. Chou, T. Sun, S. Hsiung, and J. Hsieh, 2006, Study on The Uric Acid Biosensor by The Potentiometric Principle, *Inst. of Elec. Engineering National Yunlin Univ. of Sci. and Tech.*, 1-10

- Magalhaes, J., and A. Machado, 2002, Array of Potentiometric Sensors for The Analysis of Creatinine in Urine Samples, *The Royal Soc. of Chem.*, 127, 1069-1075, <http://www.rsc.org/analyst>, tanggal akses: 15 Maret 2007
- Minteer, S., K. Tamara, and Y. Bor, 2006, Nanopore Engineering of Chitosan Polymer for Enzyme Immobilization and Stabilization, <http://www.aiche.org.pdf>, tanggal akses: 12 Desember 2007, 1-2
- Mohanty, S.P., 2001, Biosensors: A Survey Report, *Dept. of Comp. Sci. and Engineering Univ. of South Florida*, 2-8
- Pijanowska, D.G., M Dawgul, and W. Torbich, 2005, Comparison of Urea Determination in Biological Samples by Enfers Based on pH and pNH₄ Detection, *J. Biosens. for Bioanal. App.*, 53, 4-7, <http://www.mdpi.net>, tanggal akses: 14 Agustus 2005
- Rao, G., and A. Mulchandani, 2005, Biosensor Construction, <http://www.jaist.ac.jp>, tanggal akses: 29 April 2005, 8-10
- Sa'adah, B., 1996, Karakterisasi Ekstrak Kasar Enzim Urikase Hasil Isolasi dari Candida Utilis, Skripsi, Jurusan Kimia Universitas Brawijaya, Malang, 45
- Suhartono, M.T., 1989, **Enzim dan Bioteknologi**, Pusat Antaruniversitas Bioteknologi, Bogor, 48-51
- Sujatmiko, M., 2005, Asam Urat, <http://www.freelists-180.iquest.net>, tanggal akses: 15 Maret 2007, 1-2
- Turner, O.G., Karhade, and S.S. Chiluveru, 1987, **Analytical Chemistry: An Open Learning**, Rough Van Peer Co., USA, 137-139
- Wroblewski, W., 2005, Ion Selective Electrodes, <http://www.csrg.ch.pw.edu.pl>, tanggal akses: 20 Desember 2007, 47-49

LAMPIRAN

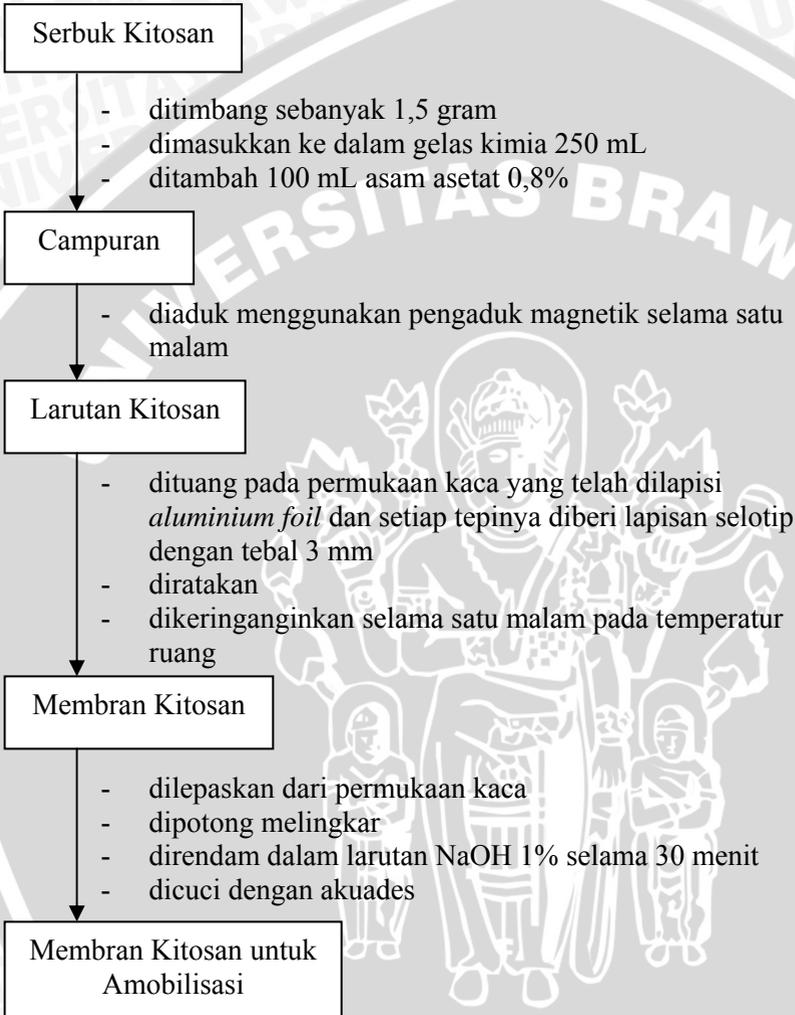
L.1 Diagram Alir

L.1.1 Skema Penelitian



L.1.2 Pembuatan membran kitosan dan amobilisasi urikase

L.1.2.1 Pembuatan membran kitosan



L.1.2.2 Pembuatan asam asetat 0,8%

Asam Asetat Glisial 100%

- dipipet sebanyak 0,8 mL dengan pipet ukur
- dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL
- ditandabatkan dengan penambahan akuades
- dikocok sampai homogen

Asam Asetat 0,8%

L.1.2.3 Pembuatan larutan NaOH 1%

Padatan NaOH

- ditimbang sebanyak 1 gram
- dilarutkan dalam ± 20 mL akuades dalam gelas kimia 50 mL

Larutan NaOH pekat

- dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL
- ditandabatkan dengan penambahan akuades
- dikocok hingga homogen

Larutan NaOH 1%

L.1.2.4 Amobilisasi urikase

Membran Kitosan untuk Amobilisasi

- dicelupkan dalam larutan asam asetat pH 4
- dicuci dengan akuades
- dimasukkan ke urikase hasil isolasi dari *Candida utilis*
- dilakukan perendaman selama 3, 6, 9, 12, 15, dan 24 jam

Urikase Amobil

L.1.3 Pembuatan larutan buffer fosfat pH 9

L.1.3.1 Pembuatan larutan NaOH 0,1 M

Padatan NaOH

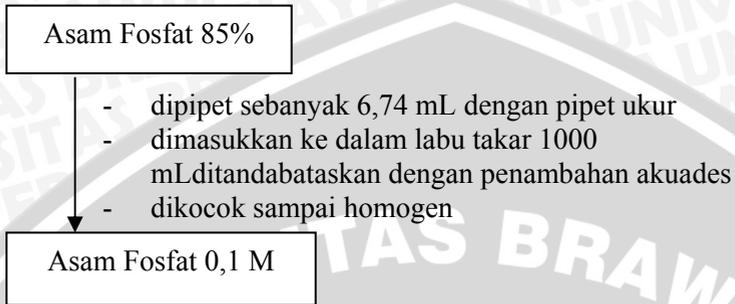
- ditimbang sebanyak 4 gram
- dilarutkan dalam ± 100 mL akuades dalam gelas kimia 250 mL

Larutan NaOH pekat

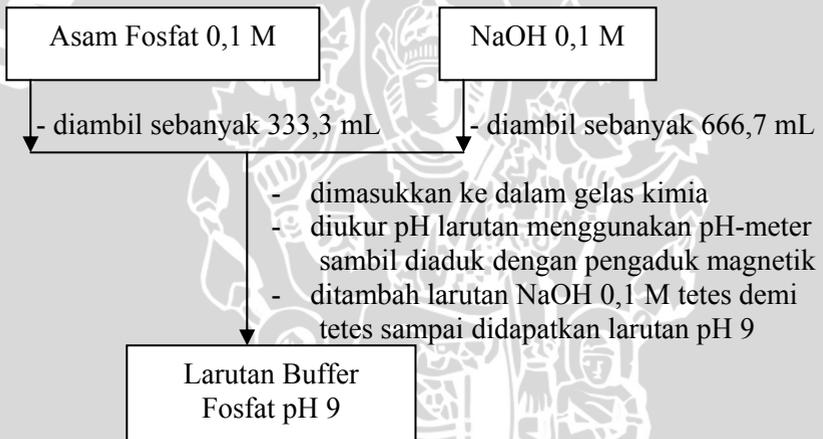
- dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 1000 mL
- ditandabatkan dengan penambahan akuades
- dikocok hingga homogen

Larutan NaOH 0,1 M

L.1.3.2 Pembuatan larutan asam fosfat 0,1 M



L.1.3.3 Pembuatan larutan buffer fosfat 0,1 M



L.1.4 Pembuatan larutan asam urat

L.1.4.1 Pembuatan larutan induk asam urat 100 ppm

Asam Urat

- ditimbang sebanyak 100 mg
- dilarutkan dengan 0,8 mL NaOH 0,1 M

Larutan Asam Urat pekat

- dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu takar 1000 mL
- ditandabatkan dengan penambahan larutan buffer fosfat pH 9
- dikocok hingga homogen

Larutan Asam Urat 100 ppm

L.1.4.2 Pembuatan larutan asam urat 25 ppm

Larutan Asam Urat 100 ppm

- dipipet sebanyak 62,5; 50; 37,5; 25; dan 12,5 mL
- dimasukkan masing-masing ke dalam labu takar 250 mL
- ditandabatkan dengan penambahan larutan buffer fosfat pH 9
- dikocok hingga homogen

Larutan Asam Urat 25, 20, 15, 10, dan 5 ppm

L.1.5 Isolasi Urikase dari *Candida utilis*

L.1.5.1 Pembuatan larutan asam asetat 0,2 M

Asam Asetat Glisial

- dipipet sebanyak 1,15 mL
- dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL
- ditandabatkan dengan penambahan akuades
- dikocok sampai homogen

Asam Asetat 0,2 M

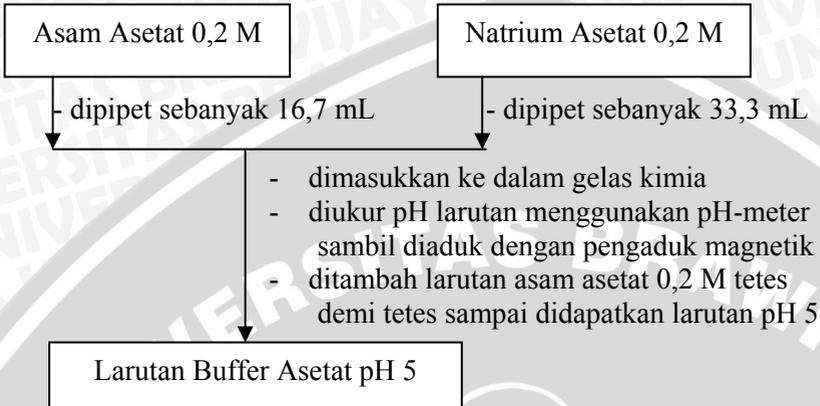
L.1.5.2 Pembuatan larutan natrium asetat 0,2 M

Natrium Asetat

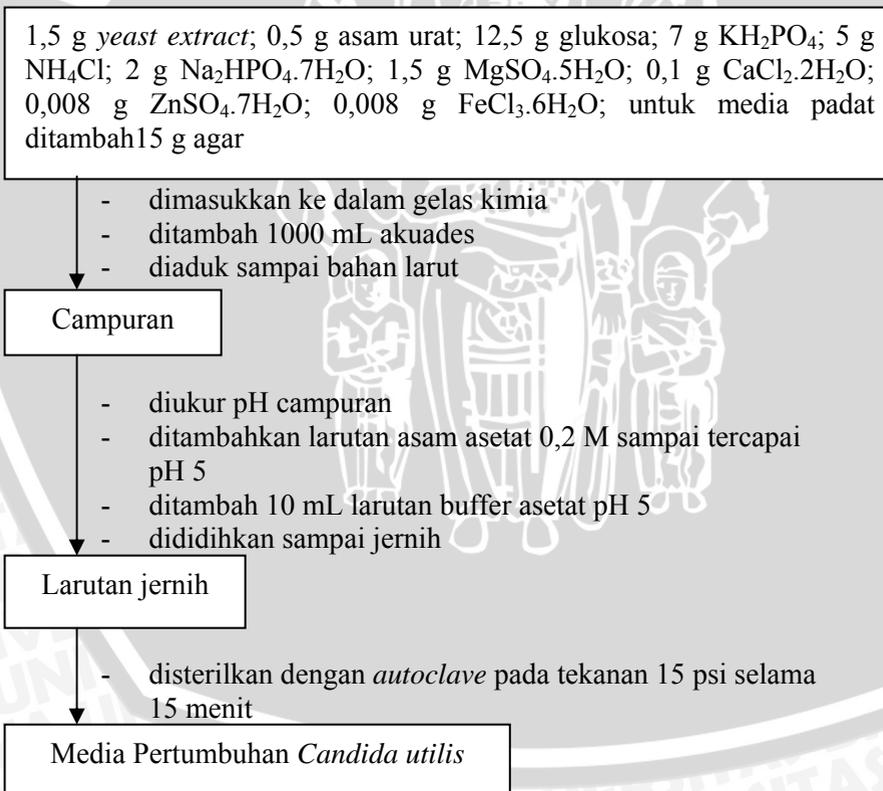
- ditimbang sebanyak 1,64 g
- dimasukkan ke dalam gelas kimia 50 mL
- ditambah \pm 10 mL akuades
- diaduk sampai larut
- dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu takar 100 mL
- ditandabatkan dengan penambahan akuades
- dikocok sampai homogen

Natrium Asetat 0,2 M

L.1.5.3 Pembuatan larutan buffer asetat pH 5



L.1.5.4 Pembuatan media pertumbuhan *Candida utilis*



L.1.5.5 Media agar miring

Media Pertumbuhan *Candida utilis* steril

- dipipet sebanyak 10 mL
- dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- didiamkan sampai menjadi padat

Media Agar Miring

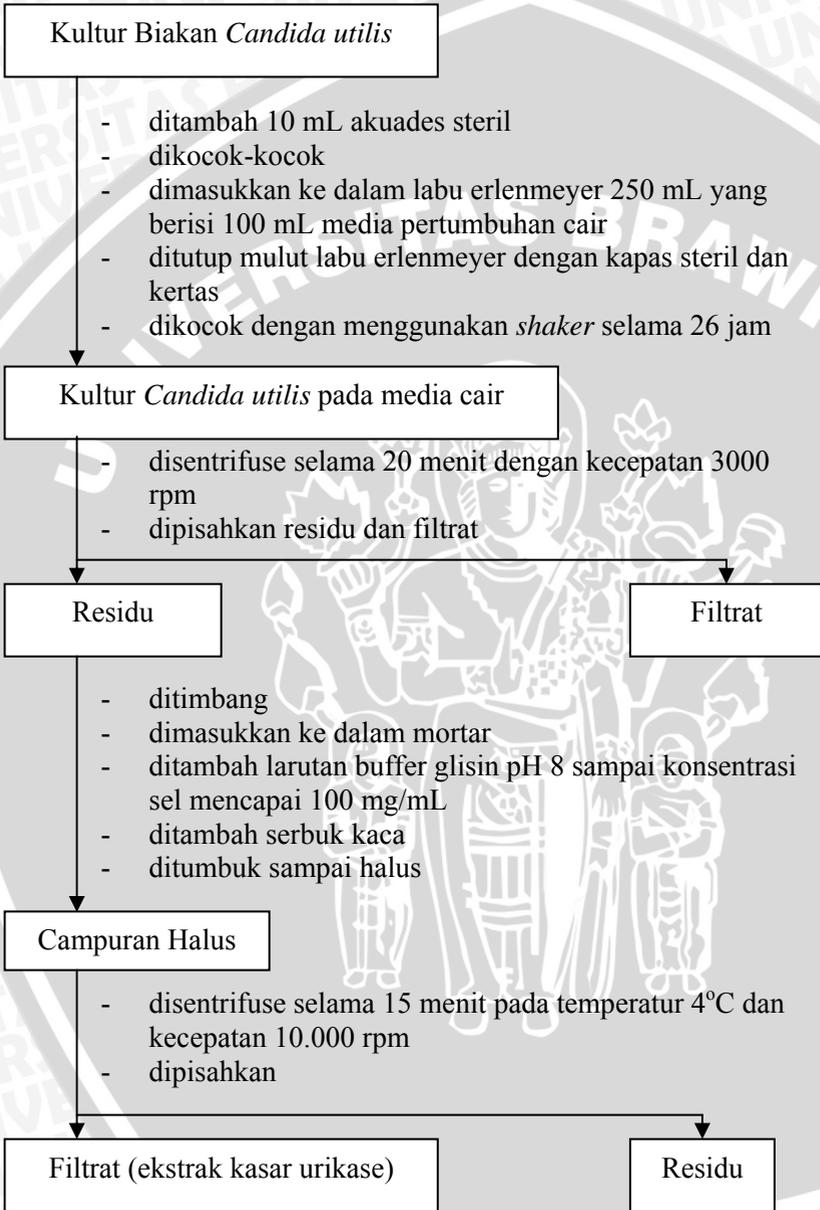
L.1.5.6 Pembiakan *Candida utilis*

Kultur Murni *Candida utilis*

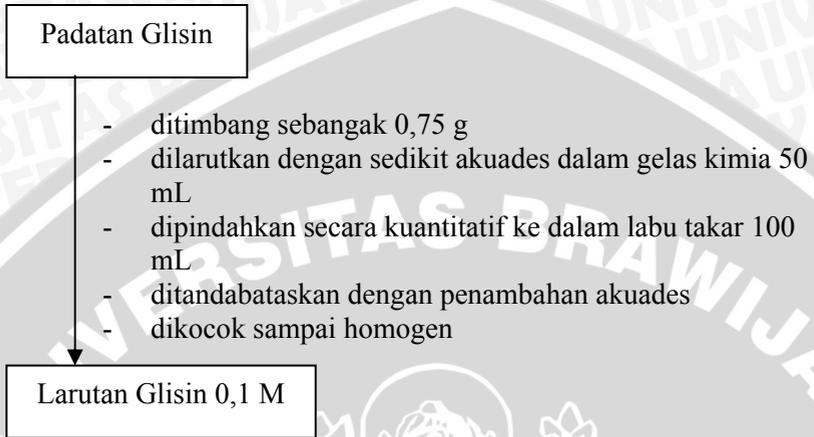
- diambil dengan menggunakan jarum ose
- diletakkan pada permukaan media agar miring
- ditutup mulut tabung reaksi dengan kapas steril dan kertas
- diinkubasi selama 24 jam
- diremajakan pada media agar miring baru setiap 24 jam selama 3 hari

Kultur Biakan *Candida utilis*

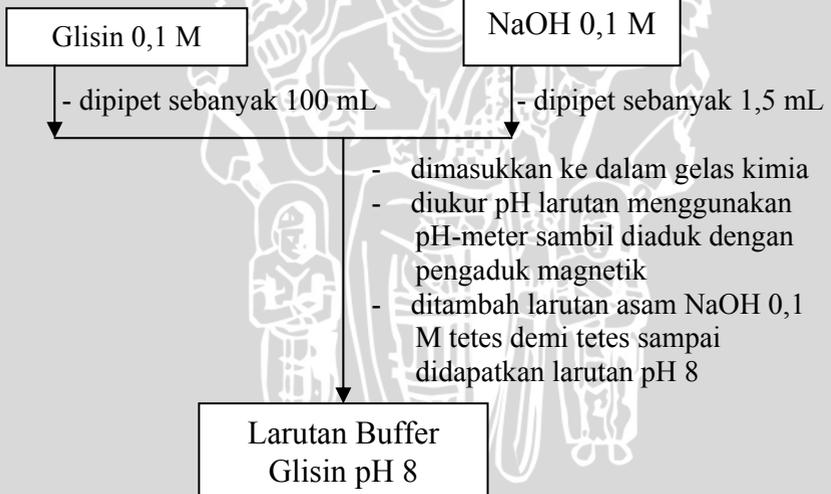
L.1.5.7 Isolasi urikase



L.1.5.8 Larutan glisin 0,1 M



L.1.5.9 Larutan buffer glisin pH 8



L.1.6 Perancangan biosensor dan pengukuran potensial sel

Elektroda Gelas

- dihubungkan dengan pH-meter
- dikalibrasi menggunakan larutan buffer standar pH 7 dan 10
- dicelupkan dalam larutan buffer fosfat pH 9 sampai didapatkan nilai potensial sel yang tetap
- dilakukan pengukuran potensial sel larutan
- dicuci elektroda dengan akuades dan dikeringkan
- dipasang membran kitosan yang mengandung urikase amobil pada elektrode

Biosensor Asam Urat

- dicelupkan dalam akuades
- dicelupkan dalam larutan buffer fosfat pH 9 sampai didapatkan nilai potensial sel yang tetap
- dilakukan pengukuran potensial sel larutan

Data Potensial Sel

L.1.7 Penentuan kadar protein

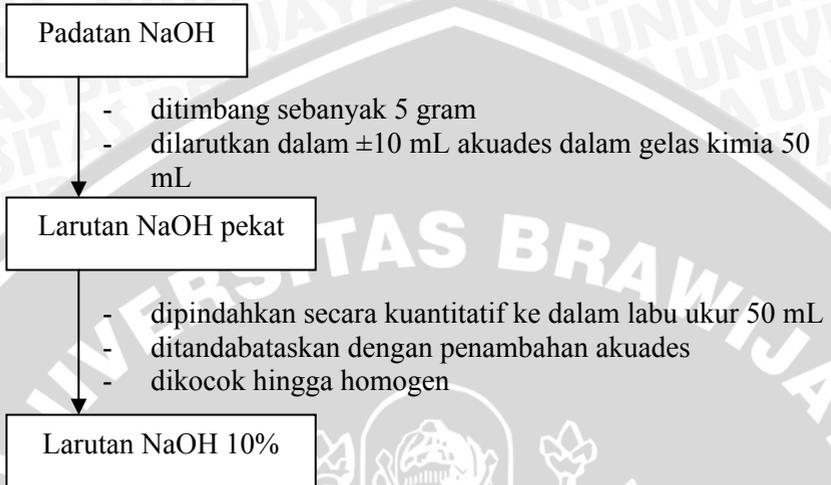
L.1.7.1 Pereaksi biuret

0,15 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,6 g $\text{NaKC}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$;
30 mL NaOH 10%

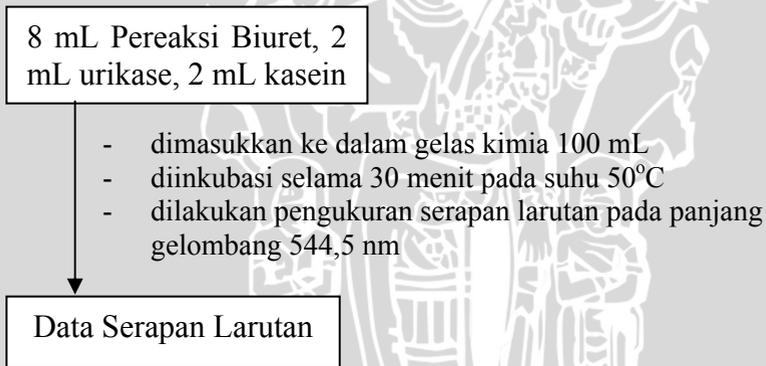
- dimasukkan ke dalam gelas kimia 50 mL
- diaduk sampai larut
- dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL
- ditandabatkan dengan penambahan akuades
- dikocok sampai homogen

Pereaksi Biuret

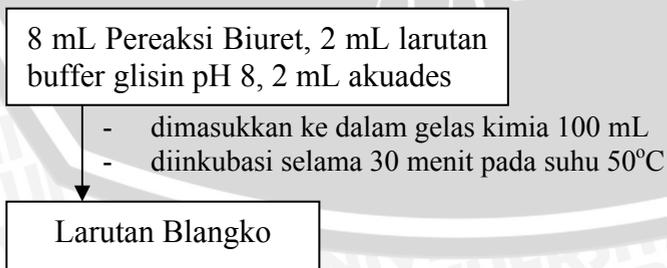
L.1.7.2 Larutan NaOH 10%



L.1.7.3 Pengukuran kadar protein urikase



L.1.7.4 Larutan blanko



L.1.7.5 Larutan induk dan larutan baku kasein

Padatan kasein

- ditimbang sebanyak 1 gram
- dimasukkan dalam gelas kimia 50 mL
- ditambah 30 mL akuades dan beberapa tetes NaOH 0,1 M

Larutan kasein pekat

- dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL
- ditandabatkan dengan penambahan akuades
- dikocok hingga homogen

Larutan kasein 10.000 ppm

- dipipet sebanyak 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, dan 9 mL
- diencerkan dalam labu takar 10 mL sampai tanda batas dengan penambahan akuades
- dikocok sampai homogen

Larutan kasein 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, dan 9000 ppm

- dipipet masing-masing sebanyak 2 mL
- ditambah 8 mL pereaksi biuret dan 2 mL buffer glisin pH 8
- diinkubasi selama 30 menit pada temperatur 50°C
- diukur absorbansinya pada $\lambda = 544,5$ nm dengan spektrofotometer UV-VIS

Data serapan larutan baku kasein

L.2 Perhitungan Pembuatan Larutan

L.2.1 Larutan NaOH 0,1 M

Larutan NaOH ($M_r = 40 \text{ g/mol}$) 0,1 M dibuat sebanyak 1 L, sehingga massa NaOH yang dibutuhkan sebanyak:

$$\text{massa NaOH} = 0,1 \text{ mol/L} \times 1 \text{ L} \times 40 \text{ g/mol} = 4 \text{ g}$$

Jadi 4 gram padatan NaOH dilarutkan menjadi 1 L dengan penambahan akuades.

L.2.2 Larutan H_3PO_4 0,1 M

Larutan H_3PO_4 ($M_r = 98 \text{ g/mol}$, $[\text{H}_3\text{PO}_4]_{\text{awal}} = 85\%$, $\rho = 1,71 \text{ g/mL}$) 0,1 M dibuat sebanyak 1 L, sehingga volume awal yang dibutuhkan:

$$\text{mol H}_3\text{PO}_4 = 0,1 \text{ mol/L} \times 1 \text{ L}$$

$$= 0,1 \text{ mol}$$

$$\text{massa H}_3\text{PO}_4 = 0,1 \text{ mol} \times 98 \text{ g/mol}$$

$$= 9,8 \text{ g}$$

$$\text{volume H}_3\text{PO}_4 = \frac{9,8 \text{ g}}{1,71 \text{ g/mL}}$$

$$= 5,73 \text{ mL}$$

untuk H_3PO_4 85%, maka volume yang diambil adalah :

$$V_1 \text{ H}_3\text{PO}_4 = 5,73 \text{ mL} \times \frac{100}{85}$$

$$= 6,74 \text{ mL}$$

Sebanyak 6,74 mL H_3PO_4 85% diencerkan menjadi 1000 mL dengan penambahan akuades.

L.2.3 Larutan baku asam urat 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm

Larutan baku asam urat dibuat dengan cara mengencerkan larutan induk asam urat (100 ppm). Contoh perhitungannya sebagai berikut:

$$V_1 = \frac{5 \text{ ppm} \times 25 \text{ mL}}{100 \text{ ppm}}$$

$$V_1 = 12,5 \text{ mL}$$

Larutan asam urat 100 ppm dipipet sebanyak 12,5; 25; 37,5; 50 dan 62,5 mL, selanjutnya masing-masing diencerkan dalam labu takar 250 mL dengan penambahan akuades.

L.2.4 Larutan glisin 0,1 M

Senyawa glisin mempunyai berat molekul 75 g/mol, maka untuk membuat larutan 100 mL glisin 0,1 M diperlukan padatan glisin sebanyak:

$$m \text{ glisin} = 0,1 \text{ mol/L} \times 0,1 \text{ L} \times 75 \text{ g/mol} = 0,75 \text{ g}$$

Jadi dibutuhkan 0,75 g padatan glisin.

L.2.5 Larutan Na-asetat 0,2 M

Senyawa Na-asetat mempunyai berat molekul 82 g/mol, maka untuk membuat larutan 100 mL Na-asetat 0,2 M diperlukan padatan Na-asetat sebanyak:

$$m \text{ Na-asetat} = 0,2 \text{ mol/L} \times 0,1 \text{ L} \times 82 \text{ g/mol} = 1,64 \text{ g}$$

Jadi dibutuhkan 1,64 g padatan Na-asetat.

L.2.6 Larutan buffer fosfat pH 9

$$\text{Log} \left(\frac{[\text{Basa Konjugat}]}{[\text{Asam}]} \right) = 9 - 7,20 = 1,8$$

$$\frac{[\text{Basa Konjugat}]}{[\text{Asam}]} = 63,0957 \sim 63$$

Reaksi yang terjadi:



Mula-mula: 64 mol 63 mol

Reaksi: 63 mol 63 mol 63 mol

Sisa: 1 mol 0 mol 63 mol

NaH_2PO_4 sebanyak 64 mol merupakan hasil reaksi H_3PO_4 dan NaOH, sehingga perhitungannya menjadi:



Mula-mula: 64 mol 64 mol

Reaksi: 64 mol 64 mol 64 mol

Sisa: 0 mol 0 mol 64 mol

Jumlah NaOH yang diperlukan merupakan jumlah keseluruhan dari kedua reaksi, yaitu: 63 mol + 64 mol = 127 mol.

Perbandingan jumlah H_3PO_4 dan NaOH yang dicampurkan:

$$\text{H}_3\text{PO}_4 : \text{NaOH} = 64 : 127 \sim 1 : 2$$

Jika $[\text{H}_3\text{PO}_4] = 0,1\text{M}$; $[\text{NaOH}] = 0,1\text{M}$ dan volume total campuran 1000 mL, maka volume yang dicampurkan adalah $\text{H}_3\text{PO}_4 = 333,3 \text{ mL}$ & $\text{NaOH} = 666,7 \text{ mL}$.

L.3 Penentuan Kadar Protein

Kadar protein urikase perlu ditentukan untuk mengetahui jumlah urikase yang teramobilkan pada membran kitosan. Penentuan kadar protein dilakukan secara spektrofotometri dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS Shimadzu 1601 pada panjang gelombang 544,5 nm. Larutan baku yang digunakan adalah larutan kasein dengan berbagai konsentrasi antara 0 sampai 1500 ppm. Pada penentuan kadar protein urikase, digunakan larutan kasein 833,3 ppm.

L.3.1 Perhitungan pembuatan larutan baku kasein

Larutan baku kasein dengan berbagai konsentrasi dibuat dengan cara mengencerkan larutan induk kasein 10.000 ppm dengan perhitungan sebagai berikut:

- Untuk konsentrasi 833,3 ppm

Awalnya larutan kasein 10.000 ppm diencerkan menjadi 5000 ppm dengan perhitungan:

$$V_1 = \frac{5000 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}}{10.000 \text{ ppm}}$$

$$V_1 = 5 \text{ mL}$$

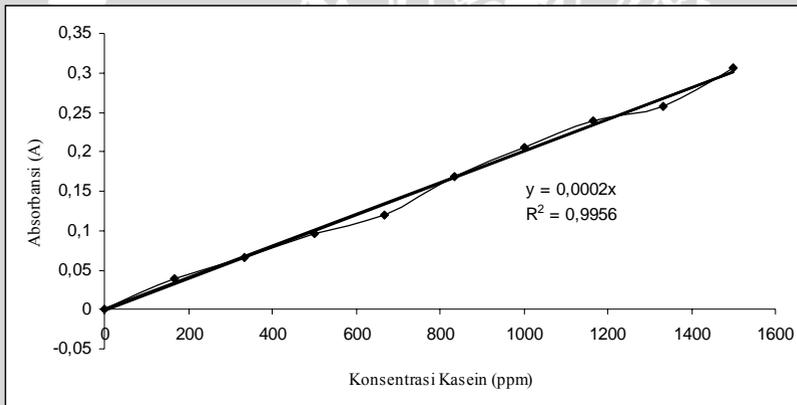
Jadi dipipet 5 mL kasein 10.000 ppm dan diencerkan dalam labu takar 10 mL. Kemudian diambil 2 mL larutan kasein tersebut, ditambah 8 mL reagen biuret dan 2 mL buffer glisin pH 8 sehingga volume total menjadi 12 mL. Konsentrasi akhir kasein menjadi:

$$[\text{Kasein}] = 2/12 \times 5000 \text{ ppm} = 833,3 \text{ ppm}$$

L.3.2 Kurva baku kasein

Tabel L.3.2 Absorbansi larutan baku kasein ($\lambda = 544,5 \text{ nm}$)

C_{kasein} (ppm)	A_1	A_2	A_3	$A_{\text{rata-rata}}$
0	0	0	0	0
166,6	0,042	0,042	0,033	0,039
333,3	0,067	0,063	0,069	0,066
500,0	0,098	0,093	0,100	0,097
666,6	0,123	0,120	0,116	0,120
833,3	0,180	0,174	0,151	0,168
1000,0	0,206	0,196	0,217	0,206
1166,6	0,237	0,241	0,239	0,239
1333,3	0,255	0,266	0,255	0,258
1500,0	0,308	0,320	0,293	0,307



Gambar L.3.2 Kurva baku absorbansi kasein

L.3.3 Data pengukuran absorbansi urikase

Tabel L.3.3 Absorbansi urikase ($\lambda = 544,5 \text{ nm}$)

Lama amobilisasi (jam)	Absorbansi (A)
0	0,2537
3	0,2242
6	0,2189
9	0,2167
12	0,2159
15	0,2156
24	0,2141

L.3.4 Perhitungan massa urikase amobil dan asam urat teroksidasi

Dari kurva baku didapatkan persamaan garis lurus yaitu:

$$y = 2.10^{-4} x$$

dimana y = nilai absorbansi (A)

x = konsentrasi kasein + enzim (ppm)

Contoh perhitungannya sebagai berikut:

- $y = 0,2537$

$$x = y/2.10^{-4} = 0,2537/2.10^{-4} = 1268,5 \text{ ppm}$$

$$C_{\text{enzim}} = x - 833,3 \text{ ppm} = 1268,5 - 833,3 \text{ ppm}$$

$$= 435,2 \text{ ppm} = 0,4325 \text{ mg/mL}$$

$$C_{\text{enzim awal}} = C_{\text{enzim}} \times (12/2)$$

$$= 0,4325 \text{ mg/mL} \times (12/2) = 2,612 \text{ mg/mL}$$

- $y = 0,2242$

$$x = y/2.10^{-4} = 0,2242/2.10^{-4} = 1121 \text{ ppm}$$

$$C_{\text{enzim}} = x - 833,3 \text{ ppm} = 1121 - 833,3 \text{ ppm}$$

$$= 287,7 \text{ ppm} = 0,2877 \text{ mg/mL}$$

$$C_{\text{enzim tidak teramobilkan}} = C_{\text{enzim}} \times (12/2)$$

$$= 0,2877 \text{ mg/mL} \times (12/2) = 1,7262 \text{ mg/mL}$$

$$C_{\text{enzim amobil}} = C_{\text{enzim awal}} - C_{\text{enzim tidak teramobilkan}}$$

$$= 2,612 \text{ mg/mL} - 1,7262 \text{ mg/mL} = 0,8858 \text{ mg/mL}$$

Volume enzim yang digunakan sebanyak 5 mL, sehingga massa enzim amobil sebesar:

$$m_{\text{enzim amobil}} = C_{\text{enzim amobil}} \times 5 \text{ mL} = 0,8858 \text{ mg/mL} \times 5 \text{ mL}$$

$$= 4,43 \text{ mg}$$

Jumlah asam urat yang mengalami reaksi oksidasi dapat ditentukan melalui contoh perhitungan berikut ini:

aktivitas urikase pada pH 9 = 0,3111 unit = 0,3111 $\mu\text{mol/mg}\cdot\text{menit}$
 massa asam urat yang diubah (misalnya X):

$$X = 0,3111 \mu\text{mol/mg}\cdot\text{menit} \times 168 \text{ g/mol} \times 4,43 \text{ mg} \times 5 \text{ menit} \\ = 1,16 \text{ mg}$$

Dengan cara yang sama dihitung jumlah asam urat teroksidasi pada setiap konsentrasi urikase amobil dan didapatkan data pada Tabel L.3.5.

L.3.5 Data massa urikase teramobilkan dan asam urat teroksidasi

Tabel L.3.5 Jumlah urikase teramobilkan dan asam urat teroksidasi pada lama amobilisasi 3-24 jam

Lama amobilisasi (jam)	Jumlah urikase yang teradsorpsi (mg)	Jumlah asam urat yang teroksidasi (mg)
3	4,43	1,16
6	5,20	1,36
9	5,55	1,45
12	5,65	1,48
15	5,70	1,50
24	5,95	1,55

L.4 Data Pengukuran Potensial Sel (E_{sel})

L.4.1 Data pengukuran potensial sel larutan asam urat 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm pada lama amobilisasi 3, 6, 9, 12, 15, dan 24 jam

Tabel L.4.1.1 Data potensial sel larutan asam urat 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm pada pH 9 dan lama amobilisasi 3 jam

$C_{\text{asam urat}}$ (ppm)	E_{sel} (mV)					
	1	2	3	4	5	6
5	-85	-70	15	-79	-75	4
10	-88	-76	12	-83	-81	2
15	-88	-78	10	-81	-81	0
20	-87	-80	7	-81	-82	-1
25	-85	-79	6	-82	-81	1

Tabel L.4.1.2 Data potensial sel larutan asam urat 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm pada pH 9 dan lama amobilisasi 6 jam

C _{asam urat} (ppm)	E _{sel} (mV)					
	1	2	3	4	5	6
5	-86	-69	17	-79	-72	7
10	-87	-75	12	-81	-77	4
15	-84	-78	6	-79	-79	0
20	-85	-78	7	-80	-81	-1
25	-85	-78	7	-79	-80	-1

Tabel L.4.1.3 Data potensial sel larutan asam urat 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm pada pH 9 dan lama amobilisasi 9 jam

C _{asam urat} (ppm)	E _{sel} (mV)					
	1	2	3	4	5	6
5	-80	-73	7	-73	-66	7
10	-73	-71	2	-69	-68	1
15	-83	-77	6	-79	-76	3
20	-75	-75	0	-71	-74	-3
25	-81	-76	5	-77	-77	0

Tabel L.4.1.4 Data potensial sel larutan asam urat 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm pada pH 9 dan lama amobilisasi 12 jam

C _{asam urat} (ppm)	E _{sel} (mV)					
	1	2	3	4	5	6
5	-77	-65	12	-74	-66	8
10	-77	-71	6	-75	-70	5
15	-80	-76	4	-77	-75	2
20	-78	-71	7	-66	-69	-3
25	-80	-76	4	-76	-76	0

Tabel L.4.1.5 Data potensial sel larutan asam urat 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm pada pH 9 dan lama amobilisasi 15 jam

C _{asam urat} (ppm)	E _{sel} (mV)					
	1	2	3	4	5	6
5	-75	-72	3	-72	-68	4
10	-79	-74	5	-77	-73	4
15	-78	-77	1	-77	-77	0
20	-69	-73	-4	-69	-73	-4
25	-80	-78	2	-76	-76	0

Tabel L.4.1.6 Data potensial sel larutan asam urat 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm pada pH 9 dan lama amobilisasi 24 jam

C _{asam urat} (ppm)	E _{sel} (mV)					
	1	2	3	4	5	6
5	-93	-75	18	-64	-50	14
10	-92	-78	14	-62	-52	10
15	-90	-81	9	-63	-58	5
20	-91	-84	7	-64	-58	6
25	-88	-82	6	-62	-58	4

Keterangan: E_{sel} 1 dan 4 = E_{sel} tanpa urikase amobil

2 dan 5 = E_{sel} dengan urikase amobil

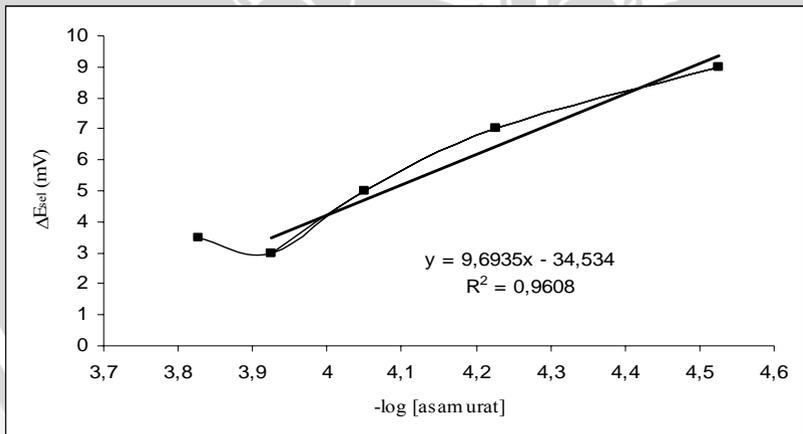
3 dan 6 = ΔE_{sel}

L.4.2 Data pengukuran ΔE_{sel} untuk penentuan waktu respon

Tabel L.4.2 Data ΔE_{sel} larutan asam urat 5, 10, dan 15 ppm pada waktu 0 sampai 360 detik

Waktu (detik)	ΔE_{sel} (mV)		
	5 ppm	10 ppm	15 ppm
0	1	-14	-15
30	12	6	5
60	12	6	3
90	11	5	3
120	10	5	3
150	10	5	2
180	9	5	3
210	9	5	3
240	8	5	3
270	8	5	3
300	7	5	3
330	7	5	4
360	7	5	3

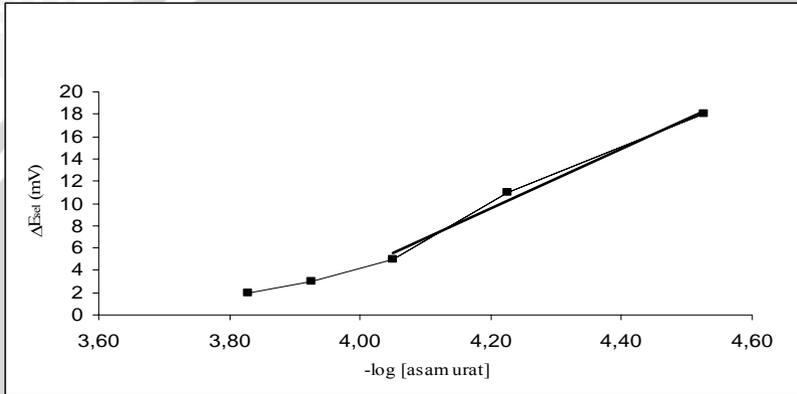
L.5 Contoh Penentuan Bilangan Nernst



Gambar L.5 Kurva penentuan bilangan Nernst

Dari Gambar L.5 didapatkan persamaan garis $y = 9,6935x - 34,534$. Dari persamaan tersebut dapat diketahui bahwa nilai bilangan Nernst yang didapatkan sebesar 9,6935 mV/dekade.

L.6 Penentuan Kisaran Konsentrasi dan Batas Deteksi



Gambar L.6 Grafik hubungan antara $-\log [\text{asam urat}]$ dan ΔE_{sel}

Berdasarkan Gambar E.5.1, diketahui bahwa kisaran konsentrasi biosensor asam urat terletak pada daerah konsentrasi 5 sampai 15 ppm dan batas atas deteksi tidak dapat ditentukan. Untuk setiap lama amobilisasi, nilai kisaran konsentrasi dapat dilihat pada Tabel 4.2.