

**PENGARUH JUMLAH URIKASE AMOBIL PADA
PEMBUATAN BIOSENSOR ASAM URAT**

TUGAS AKHIR

oleh:

ACHMAD NIZAR

0410920002-92



JURUSAN KIMIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2008

**PENGARUH JUMLAH URIKASE AMOBIL PADA
PEMBUATAN BIOSENSOR ASAM URAT**

TUGAS AKHIR

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

oleh:

ACHMAD NIZAR

0410920002-92



JURUSAN KIMIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2008

LEMBAR PENGESAHAN TUGAS AKHIR

**PENGARUH JUMLAH URIKASE AMOBIL PADA
PEMBUATAN BIOSENSOR ASAM URAT**

oleh:
ACHMAD NIZAR
0410920002-92

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal
Dan dinyatakan memenuhi untuk memperoleh gelar Sarjana
Sains dalam bidang Kimia

Dosen Pembimbing I

Dosen Pembimbing II

Dr. Ani Mulyasuryani, MS
NIP. 131 960 438

Arie Srihardvastutie, S.Si., MKes
NIP. 130 300 328

Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas MIPA
Universitas Brawijaya

M. Farid Rahman, SSi, MSi
NIP. 132 158 726

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Achmad Nizar
NIM : 0410920002-92
Jurusan : Kimia
Penulis skripsi berjudul :

” Pengaruh Jumlah Urikase Amobil pada Pembuatan Biosensor 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 dikemudian 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, Januari 2008
Yang menyatakan,

Achmad Nizar
NIM. 0410920002-92

PENGARUH JUMLAH URIKASE AMOBIL PADA PEMBUATAN BIOSENSOR ASAM URAT

ABSTRAK

Biosensor asam urat dapat digunakan untuk menentukan konsentrasi asam urat secara potensiometri. Biosensor asam urat dibuat dengan melapisi permukaan elektroda gelas menggunakan urikase yang diamobilkan pada membran kitosan. Asam urat akan dioksidasi menjadi alantoin, CO_2 , dan H_2O_2 oleh adanya urikase. Gas CO_2 akan terlarut dalam air membentuk H_3O^+ dan HCO_3^- . Perubahan konsentrasi H_3O^+ akan menghasilkan potensial sel. Konsentrasi H_3O^+ yang dihasilkan melalui reaksi oksidasi asam urat dipengaruhi oleh jumlah urikase amobil. Potensial sel yang dihasilkan pada setiap konsentrasi asam urat berhubungan dengan kinerja biosensor. Oleh karena itu diteliti tentang pengaruh jumlah urikase amobil terhadap kinerja biosensor asam urat. Kinerja biosensor ditunjukkan oleh kisaran konsentrasi, batas deteksi, faktor Nernst, dan waktu respon pada jumlah urikase amobil 17,2; 12,8; 8,7; 5,7; dan 2,0 mg. Kinerja biosensor dapat diketahui dengan mengukur besarnya potensial sel larutan asam urat pada konsentrasi 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm. Dari hasil penelitian, diperoleh kinerja biosensor asam urat optimum pada jumlah urikase amobil 12,8 mg dengan bilangan Nernst 28,8 mV/dekade, kisaran konsentrasi asam urat yang dapat diukur adalah 10 ppm hingga 25 ppm, batas deteksi sebesar 10,09 ppm, dan waktu respon biosensor adalah 270 detik.



THE INFLUENCE OF IMMOBILE URICASE AMOUNT ON THE MAKING OF URIC ACID BIOSENSOR

ABSTRACT

Uric acid biosensor could be used to determined uric acid concentration potentiometrically. Uric acid biosensor can be made by coating the glass electrode with uricase which immobilized in chitosan. Uric acid would be oxidized to allantoin, CO_2 , and H_2O_2 by uricase. The CO_2 dissolved in water to form H_3O^+ and HCO_3^- . The H_3O^+ concentration produced cell potential. The H_3O^+ concentration from uric acid oxidation affected by amount of immobile uricase. The cell potential which produced from uric acid was affected biosensor performance. This research study about the influence of immobile uricase amount to biosensor performance. The biosensor performance was showed by biosensor characteristics such as concentration range, detection limit, Nernst factor, and response time in amount of uricase 17.2; 12.8; 8.7; 5.7; and 2.0 mg. The biosensor characters can be studied by measuring cell potential of uric acid solution in various concentration 5, 10, 15, 20, and 25 ppm. The result showed that the best performance of uric acid biosensor was reached at 12.8 mg immobilized uricase. Its characters are Nernstian factor 28.8 mV/decade, 10 – 25 ppm of uric acid solution concentration range, 10.09 ppm of the detection limit, and 270 seconds of response time.



KATA PENGANTAR

Dengan mengucapkan segala puji bagi Allah SWT, yang telah memberikan segala rahmatNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian untuk tugas akhir yang berjudul **Pengaruh Jumlah Urikase Amobil pada Pembuatan Biosensor Asam Urat.**

Skripsi ini dibuat sebagai persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang ilmu kimia.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa bimbingan dan bantuan dari berbagai pihak telah diterima secara nyata. Patutlah kiranya penulis menyampaikan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada:

1. Dr. Ani Mulyasuryani, M.S., selaku Dosen Pembimbing I dan Arie Srihardyastutie, S.Si., M.Si., selaku Dosen Pembimbing II atas ilmu, bimbingan, perhatian, dan nasehat yang diberikan kepada penulis selama penyusunan skripsi ini.
2. Dr. Rurini Retnowati, M.Si., selaku Dosen Penasehat Akademik yang telah memberikan arahan kepada penulis selama menempuh studi di Jurusan Kimia Universitas Brawijaya.
3. Dra. Sri Wardhani, M.Si., Dr. Diah Mardiana, M.S., Masruri, S.Si., M.Si., dan Dra. Anna R., M.App.Sc., sebagai dosen penguji.
4. M. Farid Rahman S.Si., M.Si., selaku Ketua Jurusan Kimia Universitas Brawijaya.
5. Seluruh dosen dan karyawan Jurusan Kimia Universitas Brawijaya atas segala ilmu dan bantuan yang diberikan.
6. Ayah, Ibu, kakak dan adik, atas doa, perhatian serta kasih sayangnya.
7. Teman-teman di Jurusan kimia angkatan 2004 atas semangatnya.

Tentunya masih banyak kekurangan yang ada dalam skripsi ini sehingga penulis mengharapkan saran serta kritik yang lebih menyempurnakan yang datangnya dari berbagai pihak.

Malang, Januari 2008

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB I PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	2
1.3. Batasan Masalah.....	2
1.4. Tujuan Penelitian.....	3
1.5. Manfaat Penelitian.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Biosensor.....	4
2.2. Biosensor Asam Urat.....	6
2.3. Karakteristik Biosensor Asam Urat.....	11
2.4. 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. Bahan Kimia.....	14
3.2.3. Alat Penelitian.....	14
3.3. Metode Penelitian.....	14
3.4. Cara Kerja.....	15
3.4.1. Pembuatan Biosensor Asam Urat.....	15
3.4.1.1. Pembuatan Membran Kitosan.....	15

3.4.1.2. Amobilisasi Urikase.....	15
3.4.1.3. Perancangan Biosensor Potensiometri Asam Urat.....	16
3.4.2. Pengaruh Jumlah Urikase Amobil terhadap Kinerja Biosensor Asam Urat.....	16
3.4.2.1. Penentuan Kepekaan Biosensor Asam urat.....	16
3.4.2.2. Penentuan Batas Deteksi dan Kisaran Konsentrasi Biosensor Asam Urat.....	17
3.4.2.3. Penentuan Waktu Respon Biosensor Asam Urat.....	17

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Pengaruh Jumlah Urikase Amobil terhadap Kinerja Biosensor Asam Urat.....	19
4.2. Karakter Biosensor Asam Urat.....	23
4.3. Mekanisme Deteksi Biosensor Asam Urat.....	24

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

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

DAFTAR PUSTAKA	27
LAMPIRAN	29



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. Skema Biosensor Asam Urat.....	7
Gambar 2.2. Pengaruh Konsentrasi Asam Urat terhadap Kecepatan Reaksi Enzim.....	10
Gambar 2.3. Pengaruh Jumlah Urikase terhadap Kecepatan Maksimum Reaksi Enzimatis.....	11
Gambar 3.1. Biosensor Asam Urat.....	16
Gambar 4.1. Kurva Hubungan antara $-\log$ [Asam Urat] terhadap ΔE_{sel} pada Berbagai Jumlah Urikase Amobil.....	20
Gambar 4.2. Kurva Hubungan antara Jumlah Urikase Amobil terhadap Bilangan Nernst.....	21
Gambar 4.3. Kurva Hubungan antara Perubahan Potensial Sel Biosensor Asam Urat dengan Waktu.....	24
Gambar 4.4. Mekanisme Deteksi Biosensor Asam Urat.....	25
Gambar L.4.1. Kurva Baku Kasein.....	45
Gambar L.5.2. Kurva Hubungan ΔE_{sel} dengan $-\log$ [Asam Urat] pada Masing-masing Konsentrasi Urikase.....	51
Gambar L.5.3. Kurva Hubungan ΔE_{sel} dengan $-\log$ [Asam Urat].....	51

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1.	Potensial Sel pada Berbagai Konsentrasi Asam Urat dengan Jumlah Urikase Amobil 12,8 mg..... 18
Tabel 4.2.	Batas Deteksi pada Berbagai Jumlah Urikase Amobil..... 23
Tabel L.2.1.	Konsentrasi Urikase Hasil Pengenceran..... 35
Tabel L.2.2.	Pembuatan Larutan Asam Urat 5, 10, 15, 20, 25 ppm..... 38
Tabel L.4.1.	Absorbansi Kasein pada λ_{maks} 544,5 nm..... 45
Tabel L.4.2.	Kadar Protein Urikase 46
Tabel L.4.3.	Jumlah Urikase yang Teramobilkan..... 47
Tabel L.5.1.	Data Hasil Pengukuran Potensial pada Berbagai Jumlah Urikase Amobil..... 48
Tabel L.5.2.	Data Hasil Pengukuran Waktu Respon pada Setiap Konsentrasi Asam Urat..... 50
Tabel L.5.3.	Data Kemampuan Mengubah Asam Urat Maksimum..... 52
Tabel L.5.4.	Data Pengukuran Ketebalan Membran Kitosan Menggunakan Mikrometer Sekrup..... 52

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
LAMPIRAN 1	Diagram Alir Metode Penelitian..... 29
LAMPIRAN 2	Pembuatan Larutan 35
LAMPIRAN 3	Isolasi Urikase dari <i>Candida utilis</i> 42
LAMPIRAN 4	Penentuan Kadar Protein..... 45
LAMPIRAN 5	Data Hasil Penelitian 48



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Asam urat dalam tubuh manusia merupakan produk oksidasi akhir dari metabolisme purin (Rawn, 1989). Manusia memproduksi asam urat hanya dalam jumlah yang kecil, dan kelebihanya terakumulasi dalam tubuh yang dapat menimbulkan *gout*. Kadar asam urat dalam darah normal adalah 2-4 mg/100 mL (Catarow dan Trumper, 1962). Jika kadar asam urat dalam darah melebihi batas normal maka dapat dipastikan orang tersebut mengalami penyakit asam urat.

Metode penentuan asam urat dalam darah telah dikembangkan dengan urikase menggunakan spektrofotometer. Penurunan serapan asam urat pada panjang gelombang 293 nm akibat dari kinerja urikase yang diukur secara spektrofotometri setara dengan konsentrasi asam urat. Penurunan disebabkan adanya alantoin yang tidak mempunyai serapan pada panjang gelombang tersebut (Varley, *dkk.*, 1980). Pada metode ini setiap pengukuran diperlukan urikase baru sebagai pereaksi sehingga kurang efisien. Metode lain yang telah dikembangkan adalah biosensor potensiometri menggunakan dua buah enzim yaitu urikase dan katalase. Metode ini didasarkan pada perubahan konsentrasi H_3O^+ karena aktivitas katalase terhadap H_2O_2 . Metode ini memiliki batas deteksi yang rendah yaitu 3,4 mg/mL dan kisaran konsentrasi 2-7 mg/mL (Liao, 2003). Metode ini kurang selektif karena perubahan konsentrasi H_3O^+ juga berasal dari CO_2 hasil reaksi oksidasi asam urat.

Pada penelitian ini akan dirancang biosensor potensiometri yang telah dimodifikasi sebagai alat pengukur kadar asam urat. Biosensor potensiometri asam urat dibuat dengan cara melapisi elektroda sensor pH dengan urikase yang diamobilisasi pada membran kitosan. Urikase yang digunakan sebagai bioreseptor diisolasi dari *Candida utilis*. Biosensor ini didasarkan pada reaksi enzimatik asam urat sehingga memiliki selektivitas yang tinggi dibandingkan dengan metode yang telah ada, dan juga dapat dipakai secara berulang-ulang karena enzim telah diamobilisasi dalam membran kitosan. Kitosan digunakan sebagai media amobilisasi karena kitosan merupakan polisakarida inert, memiliki kekuatan

mekanik yang tinggi, bersifat hidrofobik yang tidak larut dalam air (Minteer dan Tamara, 2006). Keunggulan kitosan adalah dapat mengamobilisasi urikase secara adsorpsi sehingga tidak mempengaruhi sisi aktif urikase (Magalhaes dan Machado, 2002).

Mekanisme kerja biosensor potensiometri asam urat adalah asam urat akan dioksidasi oleh urikase yang telah diamobilisasi dalam membran kitosan menghasilkan CO_2 . Kemudian CO_2 larut dalam air membentuk H_2CO_3 yang mengalami ionisasi membentuk ion H_3O^+ yang akan menyebabkan perubahan pH larutan, sehingga sensor yang digunakan adalah sensor pH dengan menggunakan elektroda gelas.

Jumlah ion H_3O^+ yang dihasilkan bergantung pada jumlah CO_2 hasil reaksi enzimatik. Pada konsentrasi asam urat yang sama jumlah CO_2 yang dihasilkan akan dipengaruhi oleh jumlah urikase amobil. Pada persamaan Michaelis Menten konsentrasi enzim berbanding lurus terhadap kecepatan reaksi pembentukan produk (Mayes, *dkk.*, 1987). Berdasarkan hal tersebut maka jumlah urikase berpengaruh terhadap kecepatan reaksi pembentukan CO_2 sehingga akan mempengaruhi potensial sel yang dihasilkan. Potensial sel yang dihasilkan berhubungan dengan kinerja biosensor asam urat yang meliputi bilangan Nernst, kisaran konsentrasi, batas deteksi, dan waktu respon. Oleh karena itu, diperlukan penelitian lebih lanjut tentang karakterisasi biosensor asam urat untuk mengetahui pengaruh jumlah urikase amobil terhadap kinerja biosensor asam urat.

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah bagaimana pengaruh jumlah urikase amobil pada membran kitosan terhadap kinerja biosensor asam urat?

1.3. Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. ekstrak kasar urikase diisolasi dari *Candida utilis*.
2. waktu perendaman yang digunakan dalam amobilisasi urikase adalah 24 jam.
3. pH pengukuran adalah 9.
4. ketebalan membran kitosan 10,5 μm .
5. kinerja biosensor yang diamati adalah bilangan Nernst, kisaran konsentrasi, batas deteksi, dan waktu respon.

1.4. Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh jumlah urikase amobil pada membran kitosan terhadap kinerja biosensor asam urat.

1.5. Manfaat

Dari penelitian ini diharapkan akan bermanfaat dalam pembuatan biosensor asam urat berdasarkan jumlah urikase yang amobil dan untuk memberikan informasi tentang pengaruh jumlah urikase amobil terhadap kinerja biosensor asam urat.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biosensor

Biosensor adalah suatu alat yang memanfaatkan reaksi spesifik seperti enzim, antigen atau antibodi untuk melakukan suatu deteksi suatu zat kimia tertentu. Perubahan sifat fisika-kimia pada biomolekul itu yang merepresentasikan informasi ditransduksikan oleh transduser fisis menjadi besaran elektronik untuk bisa dideteksi dengan suatu detektor. Biasanya detektor harus dihubungkan dengan suatu sensor yang dapat diproses dengan komputer (Adeloju, 1999, Pijanowska, *dkk.*, 2005).

Menurut Wicaksono (2000), biosensor tersusun atas 3 bagian yaitu:

1. Elemen bioaktif sensitif (materi biologis) yang digunakan sebagai bioreseptor. Bioreseptor yang berupa molekul biologi diamobilisasi pada suatu permukaan deteksi. Interaksi yang spesifik antara analit dan bioreseptor akan menghasilkan perubahan fisika-kimia yang kemudian terdeteksi oleh permukaan deteksi dan diubah menjadi sinyal elektrik yang terukur (Rao and Mulchandani, 2005). Contohnya adalah enzim, antibodi, dan sel atau jaringan mikroorganisme.
2. Transduser. Bagian ini terletak diantara elemen biologis dan elemen detektor. Contoh transduser adalah:
 - a. Elektrokimia

Pada sistem biologis, sering terdapat reaksi redoks pada enzim, yang mana pertukaran elektronnya bisa dideteksi dengan metode elektrokimia untuk mendapatkan hubungan dengan konsentrasi zat yang terkait dalam reaksi redoks tersebut. Metode elektrokimia yang biasa dipakai antara lain:

- *Konduktometri*, transduser konduktometri didasarkan pada perubahan konduktivitas diantara dua elektroda (katoda dan anoda) yang dihasilkan dari reaksi enzimatik (Hitt, 2005).
- *Amperometri*, transduser amperometri didasarkan pada perubahan arus yang dihasilkan dari reaksi enzimatik dioksidasi atau direduksi pada permukaan elektroda kerja (katoda atau anoda) sehingga terjadi

peningkatan arus. Perubahan arus selama proses reduksi atau oksidasi sesuai dengan jumlah zat hasil reaksi enzimatis (Chaplin, 2004).

- *Potensiometri*, dengan mengukur perubahan potensial. Prinsipnya adalah saat elektroda yang terhubung dengan bioreseptor kontak dengan analit, akan terjadi perubahan potensial. Perubahan potensial ini terjadi karena adanya reaksi enzimatis yang menyebabkan perubahan aktivitas ion analit. Parameter yang terukur adalah potensial sel larutan dan persamaan yang digunakan adalah persamaan Nernst.
- b. **Optik**
Sinyal yang terukur oleh permukaan deteksi pada biosensor optik adalah gelombang cahaya. Biosensor optik dirancang berdasarkan suatu difraksi sinar. Membran silikon yang berlapis-lapis dihubungkan dengan bioreseptor melalui suatu ikatan kovalen. Bioreseptor tersebut selanjutnya dinonaktifkan dengan mengalirkan gelombang UV. Bioreseptor akan membentuk ikatan dengan analit pada sisi aktifnya. Peristiwa tersebut menyebabkan terjadinya difraksi sinar. Difraksi sinar yang mengenai grating diubah menjadi suatu sinyal difraksi. Sinyal difraksi tersebut kemudian dikuatkan oleh amplifier untuk kemudian kembali diubah menjadi sinyal elektrik yang terukur.
- c. **Akustik**
Suatu analit yang bereaksi dengan biomolekul yang diamobilisasi pada permukaan transduser, maka massanya berubah, dan sifat akustik pun berubah. Misal pada QCM (Quartz Crystal Microbalance).
- d. **Termal**
Biosensor termal: sinyal yang terukur pada biosensor termal berupa perubahan panas. Sensor yang digunakan merupakan kombinasi suatu enzim dengan sensor termal. Saat terdapat suatu analit yang bereaksi dengan enzim akan dihasilkan panas. Panas yang dihasilkan dari reaksi enzimatis akan terukur sebagai sinyal elektrik.

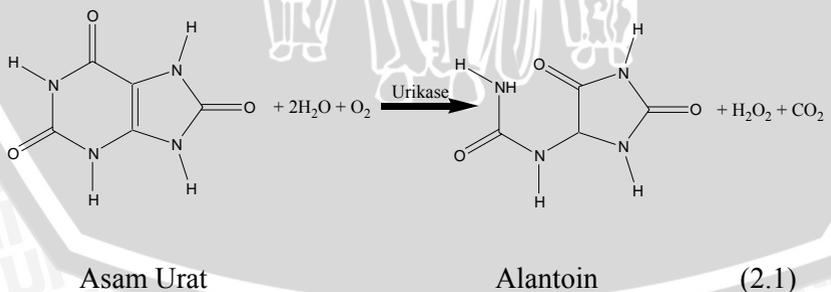
3. Elemen detektor (bekerja secara fisiko kimia).

2.2 Biosensor Asam Urat

Biosensor asam urat merupakan suatu jenis biosensor yang dapat mendeteksi kadar asam urat dalam tubuh melalui suatu reaksi enzimatik dengan menggunakan urikase yang dapat mengoksidasi asam urat menjadi alantoin, H_2O_2 , dan CO_2 . Pada biosensor potensiometri asam urat digunakan elektroda gelas yang dilapisi oleh membran selektif berupa urikase yang telah diamobilkan pada kitosan. Urikase yang digunakan merupakan hasil isolasi dari *Candida utilis* yang mempunyai aktivitas maksimum sebesar $(0,3126 \pm 0,002)$ unit pada kondisi optimum yaitu pH 9,0 dan temperatur $30^\circ C$ (Sa'adah, 1996). Secara elektrokimia, pH pada elektroda gelas merupakan fungsi dari potensial sehingga biosensor asam urat ini dapat digolongkan sebagai biosensor potensiometri.

Kitosan merupakan suatu polimer organik yang tersusun atas kitin. Kitosan dapat digunakan sebagai membran untuk amobilisasi suatu enzim dengan cara adsorpsi. Pembuatan membran kitosan adalah dengan melarutkan kitosan pada asam asetat 0,8% selama semalam, kemudian dituang pada suatu plat datar dan dipanaskan pada temperatur $60^\circ C$ selama 12 jam. Setelah kering akan dihasilkan membran yang kemudian dinetralkan dengan larutan NaOH 1% selama 30 menit. Kemudian dibilas dengan air dan direndam dalam air sampai membran digunakan. Apabila membran akan digunakan untuk amobilisasi suatu enzim maka sebelumnya membran direndam dalam asam asetat pH 4 dan dibilas air kembali, kemudian direndam pada larutan enzim pada temperatur $5^\circ C$ selama satu malam (Magalhaes dan Machado, 2002).

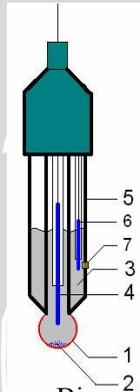
Reaksi yang terjadi pada asam urat dan urikase pada semua jenis mamalia kecuali primata dan beberapa spesies lain adalah sebagai berikut (Mayes, *dkk.*, 1987):



Karbon dioksida dalam larutan akan membentuk asam karbonat yang terionisasi dalam air membentuk ion H_3O^+ sehingga

mempengaruhi harga pH larutan. Perubahan pH dapat dideteksi dengan menggunakan elektroda gelas.

Skema biosensor potensiometri asam urat dapat ditunjukkan pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1. Skema Biosensor Asam Urat

Bagian dari biosensor asam urat adalah:

1. Bioreseptor (urikase amobil), yaitu biomolekul yang mengubah asam urat menjadi alantoin, H_2O_2 , dan CO_2 .
2. Membran gelas, yaitu membran yang merespon perubahan konsentrasi H_3O^+ dalam larutan.
3. Larutan internal, biasanya adalah larutan 0,1 M HCl atau larutan KCl.
4. Elektroda internal, biasanya elektroda AgCl atau elektroda kalomel
5. Badan elektroda, terbuat dari gelas nonkonduktif atau dari plastik.
6. Elektroda pembanding, mengandung elektroda AgCl atau elektroda kalomel.
7. Hubungan dengan larutan yang ditentukan, biasanya terbuat dari keramik atau kapiler dengan asbestos atau serat kuarsa.

Elektroda gelas digunakan sebagai alat sensor potensiometri yang terbuat dari gelas serta mempunyai komposisi yang spesifik. Gelas atau kaca terdiri dari senyawa SiO_2 , CaO dan Na_2O . Kation yang berupa Si^{4+} , Ca^{2+} , dan Na^+ dapat digantikan oleh ion H^+ karena memiliki muatan yang sama. Membran gelas selektif terhadap ion H^+ atau ion-ion alkali lain seperti Li^+ , Na^+ dan K^+ . Urutan selektivitas

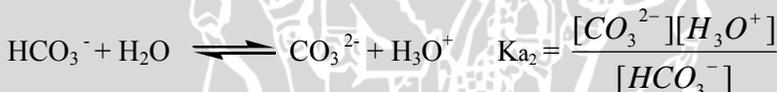
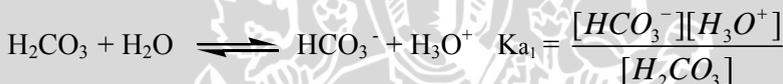
membran gelas dapat dituliskan sebagai berikut: $H^+ > Ag^+ > K^+ = NH_4^+ > Na^+ > Li^+$ (Harris, 2000).

Pada elektroda gelas, katoda merupakan elektroda indikator dan anoda merupakan elektroda pembanding luar. Potensial sel pada elektroda gelas dapat dituliskan sebagai persamaan (2.2) (Soepia dan Lieshout, 1978).

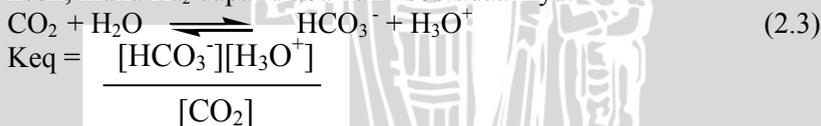
$$E_{\text{sel}} = K + 0,0592 \log [H^+] \quad (2.2)$$

$$E_{\text{sel}} = K - 0,0592 \text{ pH}$$

Pada reaksi asam urat dengan urikase akan menghasilkan CO_2 yang setara dengan kadar asam urat, CO_2 dalam larutan akan menghasilkan H_2CO_3 yang mengalami ionisasi membentuk ion H_3O^+ sehingga akan terjadi perubahan pH larutan, sehingga sensor yang digunakan adalah sensor pH dengan menggunakan elektroda gelas yang dilapisi oleh urikase amobil. Sedangkan pada larutan, karbondioksida membentuk asam karbonat yang terionisasi dalam air menjadi:



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



Karena $[CO_2]$ setara dengan $[H_2CO_3]$ yang dihasilkan, maka nilai dari K_{eq} akan setara dengan nilai K_{a1} , sehingga:

$$K_{a1} = \frac{[HCO_3^-][H_3O^+]}{[CO_2]} = \frac{[H_3O^+]^2}{C_{CO_2} - [H_3O^+]}$$

$$K_{a1}C_{CO_2} - K_{a1}[H_3O^+] = [H_3O^+]^2$$

$$[H_3O^+] = \frac{-K_{a1} + (K_{a1}^2 + 4K_{a1}C_{CO_2})^{1/2}}{2}$$

$$[H_3O^+] = (K_{a1} C_{CO_2})^{1/2}$$

$$\begin{aligned} \text{pH} &= -\frac{1}{2} \log (K_{a_1} C_{\text{CO}_2}) \\ &= -\frac{1}{2} \log K_{a_1} - \frac{1}{2} \log C_{\text{CO}_2} \\ &\quad \underbrace{\hspace{1.5cm}}_{K'} \end{aligned}$$

$$\text{pH} = K' - \frac{1}{2} \log C_{\text{CO}_2}$$

Persamaan tersebut kemudian disubstitusikan pada persamaan 2.2 dan didapatkan:

$$\begin{aligned} E_{\text{sel}} &= K - 0,0592 \text{ pH} \\ E_{\text{sel}} &= K - 0,0592 (K' - \frac{1}{2} \log C_{\text{CO}_2}) \\ &= \underbrace{K - 0,0592 K'}_{K''} + 0,0296 \log C_{\text{CO}_2} \end{aligned}$$

$$E_{\text{sel}} = K'' + 0,0296 \log C_{\text{CO}_2}$$

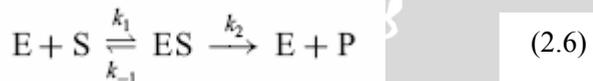
Simbol C_{CO_2} merupakan konsentrasi CO_2 awal hasil dari reaksi asam urat dengan urikase, sehingga konsentrasi CO_2 awal akan sama dengan konsentrasi asam urat, maka persamaan yang didapatkan adalah:

$$E_{\text{sel}} = K'' + 0,0296 \log C_{\text{asam urat}} \quad (2.4)$$

$$E_{\text{sel}} = K'' - 0,0296 \text{ pAsam urat} \quad (2.5)$$

Pada biosensor asam urat yang memiliki transduser tipe potensiometri, menggunakan elektroda gelas untuk mendeteksi hasil reaksi antara asam urat dengan urikase. Secara elektrokimia pH pada elektroda gelas merupakan fungsi dari potensial, sehingga biosensor semacam ini dapat digolongkan biosensor potensiometri. Oleh karena itu kadar asam urat dalam larutan dapat diketahui berdasarkan potensial selnya.

Reaksi enzimatik yang terjadi pada asam urat dan urikase dapat dipaparkan sesuai dengan reaksi 2.6 (Wang, 2001).

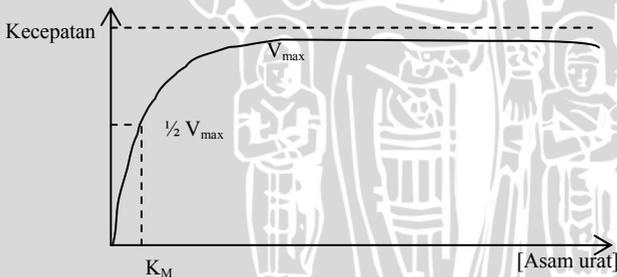


Substrat S (asam urat) akan bergabung dengan enzim E (urikase) membentuk kompleks ES (asam urat-urikase), kemudian kompleks ES akan berubah menjadi produk P dan enzim dihasilkan kembali. Laju reaksi untuk persamaan reaksi 2.6 dapat dinyatakan dalam persamaan Michaelis-Menten (2.7) (Wang, 2001).

$$v = \frac{k_2[E][S]}{K_M + [S]} \quad (2.7)$$

Dimana: K_M : konstanta Michaelis-Menten
 $k_2[E]$: V_{maks} , yaitu kecepatan maksimum reaksi enzimatis

Reaksi asam urat dengan urikase amobil untuk menghasilkan CO_2 dipengaruhi oleh besarnya konsentrasi urikase yang digunakan. Pada pembentukan kompleks urikase-asam urat, kecepatan reaksi maksimum terjadi pada konsentrasi asam urat yang tinggi. Hubungan antara pengaruh konsentrasi asam urat dengan kecepatan reaksi urikase dapat ditunjukkan pada Gambar 2.2 (Mayes, *dkk.*, 1987). Dengan meningkatnya konsentrasi substrat maka kecepatan reaksi juga meningkat tetapi peningkatan kecepatan reaksi akan semakin kecil sehingga akan dicapai titik batas dimana pada akhirnya penambahan konsentrasi substrat hanya akan meningkatkan kecepatan reaksi sedemikian kecil. Kondisi tersebut menyebabkan kecepatan reaksi tidak akan pernah mencapai titik maksimum. Batas maksimum tersebut disebut kecepatan maksimum (V_{maks}) karena enzim menjadi jenuh oleh substratnya dan tidak dapat berfungsi lebih cepat (Lehninger, 1991).



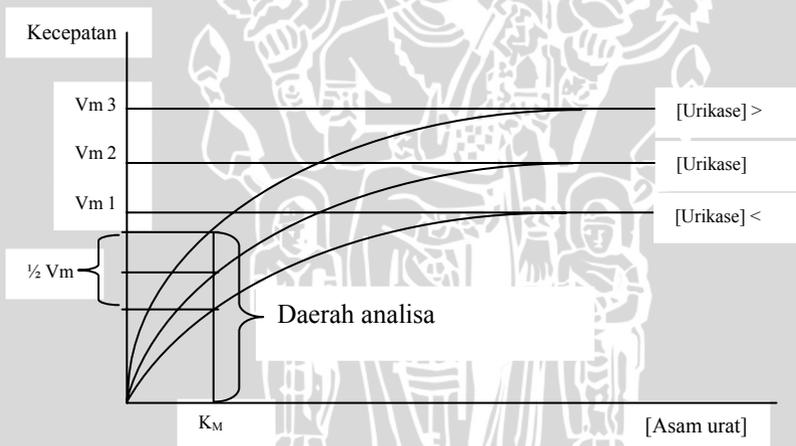
Gambar 2.2. Pengaruh Konsentrasi Asam Urat terhadap Kecepatan Reaksi Enzimatis

Berdasarkan Gambar 2.2, untuk konsentrasi urikase amobil tertentu, kecepatan reaksi akan meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi asam urat hingga mencapai kecepatan maksimum. Suatu enzim memiliki karakteristik berupa nilai K_M dan V_{maks} . K_M merupakan konsentrasi analit pada saat enzim mencapai

setengah kecepatan maksimum reaksi enzimatik. Sedangkan V_{maks} merupakan kecepatan aktivitas enzim maksimal.

Perbedaan konsentrasi urikase untuk amobilisasi akan mengakibatkan perbedaan kecepatan maksimum reaksi enzimatik asam urat oleh adanya urikase pada kondisi konsentrasi asam urat tetap. Pada reaksi enzimatik, kecepatan reaksi sebanding dengan konsentrasi enzim pada konsentrasi substrat tetap (Mayes, *dkk.*, 1987). Hal tersebut sesuai dengan persamaan 2.7. dan dapat dijelaskan sesuai Gambar 2.3.

Berdasarkan Gambar 2.3 menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi urikase yang digunakan akan meningkatkan kecepatan maksimum reaksi enzimatik. Dengan meningkatnya kecepatan maksimum maka daerah analisis akan mempunyai kemiringan yang tajam, sehingga sedikit perubahan konsentrasi asam urat akan menyebabkan perbedaan kecepatan reaksi yang cukup besar. Hal ini mengakibatkan perubahan potensial yang besar dan kepekaan pengukuran yang tinggi.



Gambar 2.3. Pengaruh Jumlah Urikase terhadap Kecepatan Maksimum Reaksi Enzimatik

2.3. Karakteristik Biosensor Asam Urat

Karakteristik biosensor asam urat ditentukan berdasarkan kinerja biosensor. Kinerja biosensor asam urat ini ditentukan melalui beberapa parameter antara lain: bilangan Nernst, kisaran konsentrasi, batas deteksi, dan waktu respon (Andreescu dan Sadik, 2004).

Kinerja biosensor asam urat dapat dilihat dari kepekaan biosensor. Kepekaan biosensor terhadap asam urat ini ditunjukkan oleh kemiringan kurva hubungan antara ΔE_{sel} dengan $-\log$ [asam urat]. Suatu biosensor yang ideal diharapkan memiliki kemiringan yang besar (Turner, *dkk.*, 1987). Perubahan potensial sel (ΔE_{sel}) sebanding dengan perubahan aktivitas H_3O^+ dalam larutan. Kepekaan dapat ditentukan pada garis linier dari kurva hubungan antara konsentrasi asam urat dengan perubahan potensial sel (ΔE_{sel}). Jumlah urikase amobil optimum yang digunakan, dapat ditentukan dengan membandingkan nilai tangen α dari kurva hubungan antara $-\log$ [asam urat] dengan ΔE_{sel} pada setiap jumlah urikase amobil. Kurva dengan tangen α terbesar terdapat pada jumlah urikase amobil optimum. Hal ini disebabkan tangen α menunjukkan kepekaan biosensor, semakin peka biosensor maka tangen α akan semakin besar.

Selain itu, parameter kinerja biosensor yang lain adalah kisaran konsentrasi dan batas deteksi. Kisaran konsentrasi adalah rentang konsentrasi yang memberikan nilai ΔE_{sel} yang sesuai konsentrasi analit. Harga ΔE_{sel} ditentukan melalui selisih pembacaan potensial dari larutan sampel tanpa membran urikase dengan menggunakan membran urikase. Kisaran konsentrasi pengukuran dapat diketahui dengan membuat kurva hubungan antara $-\log$ [asam urat] terhadap ΔE_{sel} . Biosensor yang baik akan memiliki kisaran konsentrasi yang lebar. Dari kisaran konsentrasi biosensor dapat diketahui pula batas deteksi. Batas deteksi menunjukkan batas konsentrasi terendah yang dapat direspon oleh biosensor.

Kinerja biosensor juga dapat diketahui dari parameter waktu yaitu berupa waktu respon. Waktu respon didefinisikan sebagai lamanya waktu yang diperlukan biosensor untuk mendeteksi analit sampai terukur potensial sel tetap. Proses respon biosensor dalam melakukan suatu pengukuran tidak terjadi secara langsung. Tahapan yang dilalui hingga didapatkan sinyal keluaran meliputi proses transpor analit melalui membran, reaksi dalam bioresptor, pendeteksian oleh permukaan deteksi dan pengenalan sinyal keluaran.

2.4. Hipotesis

Hipotesis yang diajukan pada penelitian ini adalah bahwa jumlah urikase amobil dapat mempengaruhi kinerja biosensor asam urat. Jumlah urikase amobil akan mempengaruhi potensial sel

larutan. Harga potensial sel berhubungan dengan kinerja biosensor asam urat yaitu bilangan Nernst, kisaran konsentrasi, batas deteksi, dan waktu respon.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB III

METODOLOGI

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Analitik Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli sampai dengan Oktober 2007.

3.2. Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1. Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah urikase hasil isolasi dari *Candida utilis* di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang.

3.2.2. Bahan Kimia

Bahan-bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini adalah asam urat, glukosa, kalium dihidrogen fosfat, amonium klorida, natrium bifosfat, magnesium sulfat pentahidrat, seng sulfat heptahidrat, kalsium klorida, ekstrak ragi, besi (III) klorida, natrium hidroksida, agar, kalium natrium tartrat, tembaga (II) sulfat, glisin, natrium asetat, asam asetat glasial 99,8%. Semua bahan kimia yang digunakan memiliki derajat kemurnian pro-analisis(p.a.) dan juga digunakan kitosan, dan akuades

3.2.3. Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah inkubator merk Heraeus tipe B-5042, jarum ose, sentrifuge dingin Jouan tipe MR 18-22, autoclave merk All American Model 25X. shaker merk Edmund tipe 25, penangas air merk Memert NR 900660, kapas, karet gelang, pH meter merk Schoot-Gerate tipe CG.820, neraca analitik Mettler tipe AE 50, oven, pembakar spiritus, freezer, magnetik stirer IKAMAG RH, elektroda gelas kombinasi, dan peralatan gelas.

3.3. Metode Penelitian

Metode penelitian yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi pembuatan urikase amobil (penyiapan media, peremajaan kultur, produksi enzim, ekstraksi enzim urikase, isolasi urikase dari *Candida utilis*), pembuatan biosensor asam urat, penentuan kinerja biosensor asam urat dilakukan dengan konsentrasi urikase yang diamobilkan yaitu 2,61 mg/mL; 2,09 mg/mL; 1,57 mg/mL; 1,04 mg/mL; 0,52 mg/mL. Penentuan karakter biosensor asam urat dilakukan dengan pengukuran potensial sel larutan asam urat pada pH 9, dan lama perendaman untuk mengamobilisasi urikase adalah 24 jam. Parameter yang diamati adalah kinerja biosensor asam urat dengan tahapan penelitian sebagai berikut:

1. Isolasi urikase dari *Candida utilis* (Lampiran 3).
2. Pembuatan biosensor asam urat.
3. Penentuan pengaruh konsentrasi urikase amobil terhadap kinerja biosensor asam urat (penentuan bilangan Nernst, kisaran konsentrasi, batas deteksi, dan waktu respon).

3.4. Cara Kerja

3.4.1. Pembuatan Biosensor Asam Urat

3.4.1.1. Pembuatan Membran Kitosan

Membran kitosan dibuat dengan cara menimbang kitosan sebanyak 1,5 g dan dilarutkan dalam asam asetat 0,8%, campuran tersebut kemudian diaduk menggunakan stirer selama 12 jam. Kemudian larutan tersebut dituangkan dalam lempengan kaca berlapis *aluminium foil* dimana pada bagian tepi kaca telah diberi isolasi dan diratakan. Setelah itu, membran dalam lempengan kaca diangin-anginkan selama 12 jam. Setelah kering dicetak bulat diameter 4 cm.

3.4.1.2. Amobilisasi Urikase

Sebanyak 5 buah membran yang telah dicetak direndam dalam larutan NaOH 1% selama 30 menit, kemudian dibilas dengan akuades dan dicelupkan ke dalam larutan asam asetat pH 4 dibilas kembali dengan akuades. Setelah itu direndam dalam larutan urikase pada konsentrasi 2,61 mg/mL; 2,09 mg/mL; 1,57 mg/mL; 1,04 mg/mL; 0,52 mg/mL sebanyak 10 mL dan lama perendaman dalam urikase adalah 24 jam pada temperatur 5°C.

3.4.1.3. Perancangan Biosensor Potensiometri Asam Urat

Membran urikase amobil yang telah dibuat dilapiskan pada permukaan membran gelas sehingga didapatkan biosensor asam urat. Biosensor potensiometri asam urat hasil perancangan digambarkan pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1. Biosensor Asam Urat

Biosensor asam urat dicelupkan ke dalam *buffer* fosfat pH 9 dan dibaca potensial yang terukur. Pengukuran potensial sel dilakukan dengan pengadukan. Kalibrasi biosensor asam urat dilakukan dengan mengukur potensial larutan *buffer* sampai diperoleh nilai potensial sel yang konstan. Setelah itu biosensor asam urat siap digunakan untuk pengukuran potensial larutan asam urat.

3.4.2. Pengaruh Jumlah Urikase Amobil Terhadap Kinerja Biosensor Asam Urat

Pengukuran potensial sel larutan asam urat dilakukan dengan menggunakan konsentrasi urikase 2,61 mg/mL; 2,09 mg/mL; 1,57 mg/mL; 1,04 mg/mL; dan 0,52 mg/mL. Konsentrasi asam urat yang diukur adalah 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm dalam waktu 5 menit.

3.4.2.1. Penentuan Kepekaan Biosensor Asam Urat

Kepekaan biosensor (bilangan Nernst) ditentukan melalui kemiringan kurva hubungan antara ΔE_{sel} dengan $-\log [\text{asam urat}]$ pada kisaran konsentrasi biosensor asam urat. Pada kisaran

konsentrasi tersebut dibuat persamaan linier $y = a + bx$. Kepekaan biosensor ditunjukkan oleh kemiringan kurva yaitu nilai b .

3.4.2.2. Penentuan Batas Deteksi dan Kisaran Konsentrasi Biosensor Asam Urat

Batas deteksi dan kisaran konsentrasi biosensor asam urat ditentukan berdasar pada kurva hubungan antara ΔE_{sel} dengan $-\log$ [asam urat]. Dari kurva tersebut, akan diketahui daerah yang menunjukkan hubungan linier antara ΔE_{sel} dan $-\log$ [asam urat]. Rentang konsentrasi asam urat pada daerah ini, menunjukkan kisaran konsentrasi asam urat yang masih dapat dideteksi oleh biosensor asam urat secara kuantitatif.

Penentuan batas deteksi dapat dilakukan dengan membuat garis singgung pada daerah kisaran konsentrasi biosensor asam urat dan daerah dibawah kisaran konsentrasinya. Titik potong dari kedua garis singgung tersebut menunjukkan batas deteksi biosensor. Nilai batas deteksi diperoleh dari ekstrapolasi titik potong garis singgung pada sumbu x .

3.4.2.3 Penentuan Waktu Respon Biosensor Asam Urat

Waktu respon ditentukan dengan cara mengukur harga potensial sel larutan asam urat selama 6 menit dan dicatat harga potensial sel setiap 30 detik. Pengukuran dilakukan pada larutan asam urat pada kisaran konsentrasi yang menunjukkan hubungan linier dengan ΔE_{sel} . Pengukuran dilakukan pada kondisi optimum biosensor asam urat. Kemudian dibuat kurva hubungan antara potensial sel larutan asam urat terhadap waktu. Dari kurva tersebut, dapat ditentukan waktu respon biosensor asam urat. Waktu respon ini ditunjukkan oleh waktu dimana potensial sel larutan asam urat mulai memberikan harga potensial sel yang stabil.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

Biosensor potensiometri asam urat dibuat dengan melapisi elektroda sensor pH dengan membran kitosan-urikase amobil. Urikase diisolasi dari *Candida utilis* dan diamobilisasi pada membran kitosan. Prinsip kerja biosensor potensiometri asam urat adalah mendeteksi perubahan potensial sel yang disebabkan oleh perubahan konsentrasi H_3O^+ . Perubahan konsentrasi H_3O^+ disebabkan oleh adanya CO_2 hasil reaksi oksidasi asam urat oleh urikase.

Biosensor yang dibuat digunakan untuk mengukur larutan asam urat dengan konsentrasi 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm. Pengukuran dilakukan baik tanpa maupun dengan menggunakan membran kitosan-urikase amobil. Pengukuran tanpa menggunakan membran kitosan-urikase amobil dilakukan sebagai blanko dan dibandingkan dengan pengukuran menggunakan membran kitosan-urikase amobil. Hal ini bertujuan untuk mengetahui perubahan potensial oleh aktivitas urikase amobil terhadap asam urat melalui selisih potensial yang dihasilkan (ΔE_{sel}).

Tabel 4.1. Potensial Sel pada Berbagai Konsentrasi Asam Urat dengan Jumlah Urikase Amobil 12,8 mg

$C_{\text{Asam urat}}$ (ppm)	E_{sel} tanpa membran (mV)	E_{sel} dengan membran (mV)	ΔE_{sel} (mV)
5	-68	-58	10
10	-78	-61	17
15	-79	-67	12
20	-77	-68	9
25	-74	-69	5

Pada pengukuran dengan menggunakan membran kitosan-urikase amobil (Tabel 4.1) potensial sel yang terukur lebih besar daripada tanpa menggunakan membran. Pada konsentrasi 5 ppm, potensial sel dengan menggunakan membran dan tanpa menggunakan membran mempunyai selisih 10 mV. Hal ini disebabkan adanya aktivitas urikase yang akan mengoksidasi asam urat sehingga meningkatkan konsentrasi H_3O^+ . Apabila konsentrasi

H_3O^+ meningkat maka harga potensial sel menjadi tinggi (Soepia dan Lieshout, 1978).

Pada konsentrasi asam urat 5 ppm mempunyai ΔE_{sel} sebesar 10 mV. Apabila konsentrasi ditingkatkan 2 kali maka harga ΔE_{sel} mengalami kenaikan 1,7 kali. Kenaikan ini terjadi karena konsentrasi H_3O^+ yang dihasilkan oleh aktivitas urikase meningkat. Pada konsentrasi asam urat 10 ppm, harga ΔE_{sel} akan menurun dengan bertambahnya konsentrasi asam urat. Pada konsentrasi asam urat 10 ppm nilai ΔE_{sel} adalah 17 mV. Apabila konsentrasi asam urat diperbesar 1,5 kali, maka ΔE_{sel} akan turun 1,4 kali sedangkan apabila diperbesar 2,5 kali maka ΔE_{sel} akan turun 3,4 kali. Penurunan ΔE_{sel} terjadi karena peningkatan konsentrasi asam urat menyebabkan kesetimbangan cepat tercapai sehingga tidak semua konsentrasi H_3O^+ terdeteksi. Penurunan potensial 1,4 kali lebih rendah dibandingkan 3,4 kali. Dengan demikian, kepekaan biosensor asam urat meningkat apabila larutan asam urat yang diukur memiliki perbedaan konsentrasi yang besar.

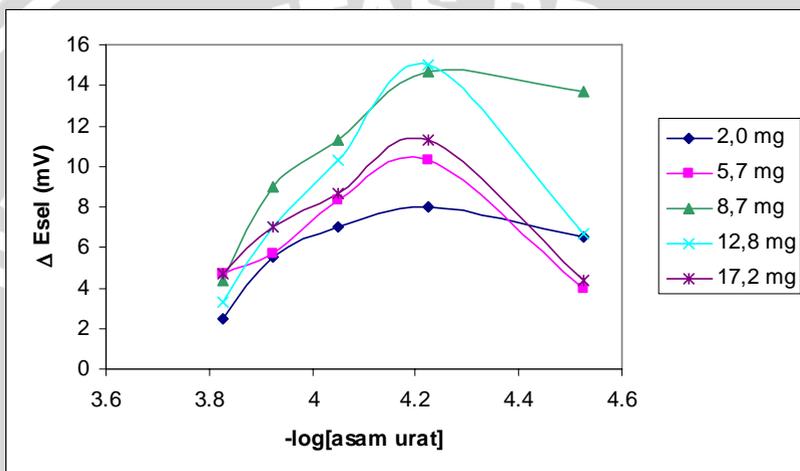
4.1. Pengaruh Jumlah Urikase Amobil terhadap Kinerja Biosensor Asam Urat

Pengaruh jumlah urikase amobil terhadap kinerja biosensor asam urat dapat ditentukan dengan mengatur jumlah urikase amobil yaitu 2 mg; 5,7 mg; 8,7 mg; 12,8 mg; dan 17,2 mg. Kinerja biosensor yang ditentukan antara lain bilangan Nernst, kisaran konsentrasi, batas deteksi dan waktu respon. Pengukuran dilakukan pada pH 9 dengan konsentrasi asam urat 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm.

Hasil pengukuran untuk setiap jumlah urikase amobil yang digunakan (Gambar 4.1) mempunyai profil kurva yang sama. Peningkatan konsentrasi asam urat mempunyai ΔE_{sel} yang menurun. Akan tetapi, pada konsentrasi asam urat 5 ppm terjadi penurunan ΔE_{sel} dari konsentrasi 10 ppm. Hal ini karena perubahan konsentrasi H_3O^+ terlalu kecil. Profil kelima kurva yang dihasilkan memiliki kemiringan yang berbeda. Pada penggunaan jumlah urikase amobil yang besar menghasilkan kemiringan kurva yang tajam (Gambar 2.3) yang disebabkan beda ΔE_{sel} setiap konsentrasi asam urat meningkat.

Pada jumlah urikase amobil 2 mg memiliki kemiringan kurva yang landai. Apabila dibandingkan dengan persamaan biosensor teoretis yang mempunyai bilangan Nernst 29,6 mV/dekade, maka nilai ΔE_{sel} larutan asam urat 10, 15, 20 dan 25 ppm berturut-turut

adalah 81, 76, 72, dan 69 mV. Berdasarkan hal tersebut maka kesalahan pengukuran pada jumlah urikase ini adalah 90 %. Disamping itu mempunyai kisaran konsentrasi yang sempit yaitu 10 ppm hingga 20 ppm. Hal ini dikarenakan jumlah urikase amobil yang rendah menyebabkan asam urat yang dioksidasi tidak maksimum. Oleh karena itu, beda potensial sel yang terdeteksi tidak sesuai dengan konsentrasi larutan asam urat.

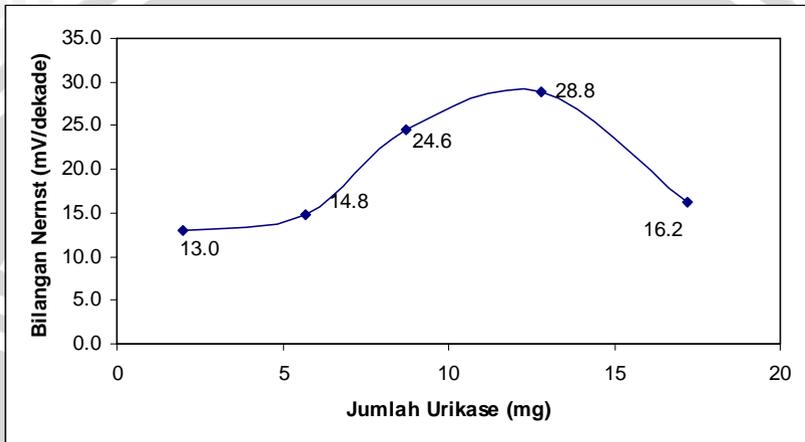


Gambar 4.1. Kurva Hubungan antara $-\log [\text{Asam Urat}]$ terhadap ΔE_{sel} pada Berbagai Jumlah Urikase Amobil

Kurva yang memiliki kemiringan tajam diperoleh pada jumlah urikase amobil 8,7 dan 12,8 mg. Pada kurva ini memiliki kisaran konsentrasi yang lebar yaitu 10 ppm hingga 25 ppm. Hal ini disebabkan oleh banyaknya urikase yang teramobilkan pada membran kitosan sehingga H_3O^+ yang dihasilkan dari reaksi oksidasi asam urat meningkat. Akan tetapi, jumlah urikase amobil yang paling baik adalah 12,8 mg. Pada jumlah urikase tersebut kemiringan kurva yang didapatkan paling tajam. Hal ini didukung dengan kesalahan pengukuran sebesar 13,5 % yang lebih kecil daripada kesalahan pengukuran jumlah urikase amobil 8,7 mg yaitu sebesar 46,64 %.

Kemiringan kurva yang dihasilkan berpengaruh terhadap harga bilangan Nernst. Hal ini berarti bahwa jumlah urikase amobil berpengaruh terhadap harga bilangan Nernst. Harga bilangan Nernst meningkat seiring dengan meningkatnya jumlah urikase amobil, tetapi pada penggunaan jumlah urikase yang terlalu besar akan

menurunkan harga bilangan Nernst (Gambar 4.2). Peningkatan harga bilangan Nernst disebabkan oleh meningkatnya kemampuan urikase amobil dalam mengubah asam urat. Dengan demikian, pada waktu pengukuran yang sama jumlah H_3O^+ yang dihasilkan dari oksidasi asam urat akan lebih besar.



Gambar 4.2. Kurva Hubungan antara Jumlah Urikase Amobil terhadap Bilangan Nernst

Pada jumlah urikase amobil 2 mg mempunyai harga bilangan Nernst paling rendah yaitu 13 mV/dekade. Hal ini disebabkan oleh rendahnya kemampuan urikase amobil untuk mengubah asam urat yaitu sebesar 0,04 mg/menit. Apabila kemampuan mengubah asam urat kecil maka asam urat yang dapat diubah berkurang sehingga H_3O^+ yang dihasilkan pada permukaan elektroda menjadi menurun. Apabila jumlah urikase amobil diperbesar menjadi 5,7 mg maka harga bilangan Nernst akan mengalami kenaikan 1,1 kali. Kenaikan bilangan Nernst yang terjadi kecil karena urikase yang teramobilkan masih terlalu rendah sehingga asam urat yang teroksidasi tidak maksimum.

Kenaikan bilangan Nernst terbesar yaitu 2,2 kali terjadi apabila urikase amobil diperbesar hingga 12,8 mg. Kenaikan ini terjadi karena urikase yang teramobilkan meningkat sehingga kemampuannya untuk mengubah asam urat bertambah menjadi 0,26 mg/menit. Hal ini menyebabkan perubahan konsentrasi H_3O^+ dari reaksi oksidasi asam urat menjadi meningkat. Sesuai dengan Gambar

2.3 kenaikan jumlah urikase akan menaikkan kecepatan maksimum reaksi enzimatis asam urat (Mayes, *dkk*, 1987) sehingga kepekaan biosensor (bilangan Nernst) menjadi meningkat. Akan tetapi, apabila jumlah urikase ditingkatkan kembali menjadi 17,2 mg maka harga bilangan Nernst justru mengalami penurunan menjadi 16,2 mV/dekade. Dengan banyaknya jumlah enzim teramobilkan maka ruang dalam pengemban (kitosan) yang tersisa akan berkurang sehingga kompleks enzim substrat tidak terbentuk secara optimal (Mahardhika, 2003).

Harga bilangan Nernst teoretis asam urat adalah 29,6 mV/dekade. Harga bilangan Nernst yang diperbolehkan adalah $29,6 \pm 5$ mV/dekade (Bailey, 1983) sehingga mempunyai kisaran $24,6 < \text{bilangan Nernst} < 34,6$ mV /dekade. Berdasarkan hasil penelitian, harga bilangan Nernst yang masuk kisaran adalah 28,8 mV/dekade pada jumlah urikase amobil 12,8 mg. Dengan demikian, pada jumlah urikase 12,8 mg biosensor asam urat memiliki kondisi optimum dengan kesalahan bilangan Nernst sebesar 2,7 %.

Setelah ditentukan parameter bilangan Nernst maka dapat ditentukan kisaran konsentrasi dan batas deteksi. Kisaran konsentrasi dan batas deteksi ditentukan berdasarkan kurva linier hubungan antara $-\log [\text{asam urat}]$ terhadap ΔE_{sel} pada setiap jumlah urikase amobil (Lampiran 5). Berdasarkan hasil yang diperoleh kisaran konsentrasi asam urat untuk setiap jumlah urikase amobil adalah sama yaitu 10 ppm hingga 25 ppm kecuali pada jumlah urikase amobil 2 mg yang mempunyai kisaran 10 ppm hingga 20 ppm. Hal ini terjadi karena urikase amobil terlalu kecil sehingga asam urat yang mampu teroksidasi tidak maksimal. Dengan demikian, pada kisaran konsentrasi 10 ppm hingga 25 ppm, pada penggunaan urikase amobil 5,7 mg; 8,7 mg; 12,8 mg; dan 17,2 mg biosensor dapat membedakan nilai ΔE_{sel} larutan asam urat namun dengan kepekaan yang berbeda.

Batas deteksi pengukuran larutan asam urat pada setiap jumlah urikase amobil ditunjukkan pada Tabel 4.2. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa batas deteksi biosensor pada setiap jumlah urikase amobil tidak jauh berbeda. Batas deteksi terendah dicapai pada jumlah urikase amobil 12,8 mg dan 17,2 mg. Hal ini diakibatkan oleh jumlah urikase yang teramobilkan tinggi sehingga asam urat yang mampu dioksidasi meningkat dan mampu mendeteksi asam urat dengan konsentrasi rendah. Dengan demikian, pada jumlah

urikase optimum yaitu 12,8 mg biosensor asam urat memiliki batas deteksi sebesar 10,09 ppm.

Tabel 4.2. Batas Deteksi pada Berbagai Jumlah Urikase Amobil

Jumlah urikase Amobil (mg)	Batas Deteksi (ppm)
17,2	10,08
12,8	10,09
8,7	10,46
5,7	10,11
2,0	10,23

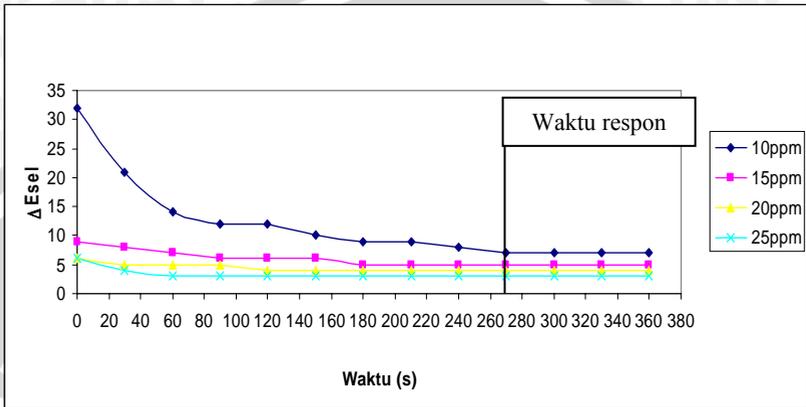
4.1. Karakter Biosensor Asam Urat

Karakter biosensor asam urat dapat ditunjukkan dari harga bilangan Nernst, kisaran konsentrasi, batas deteksi, dan waktu respon. Waktu respon ditentukan dengan mengetahui lama biosensor asam urat untuk memberikan potensial sel tetap. Potensial sel yang tetap mengindikasikan telah tercapainya kesetimbangan reaksi dalam pengukuran.

Dalam penentuan waktu respon digunakan jumlah urikase amobil optimum yaitu 12,8 mg dan larutan asam urat pada kisaran konsentrasi 10 ppm hingga 25 ppm. Hasil pengukuran dibuat kurva hubungan antara waktu terhadap ΔE_{sel} . Berdasarkan Gambar 4.3 waktu respon akan cepat tercapai bila konsentrasi asam urat meningkat. Sesuai dengan Gambar 2.2 pada jumlah urikase yang sama kecepatan reaksi enzimatik akan meningkat dengan bertambahnya konsentrasi asam urat (Mayes, *dkk*, 1987). Hal ini menyebabkan kesetimbangan reaksi akan cepat tercapai sehingga waktu respon akan menurun.

Pada konsentrasi asam urat 10 ppm harga ΔE_{sel} tetap setelah 270 detik. Hal ini karena konsentrasi asam urat kecil yang menyebabkan kecepatan reaksi enzimatik menjadi rendah sesuai persamaan 2.7 (Wang, 2001) sehingga kesetimbangan reaksi lebih lama tercapai. Apabila dibandingkan dengan konsentrasi asam urat yang lebih besar yaitu 25 ppm harga potensial sel menjadi tetap setelah 60 detik. Hal ini terjadi karena dengan peningkatan konsentrasi asam urat maka kecepatan reaksi enzimatik meningkat yang menyebabkan waktu mencapai kesetimbangan reaksi menjadi cepat (Mayes, *dkk*, 1987). Berdasarkan Gambar 4.3 dimungkinkan bahwa konsentrasi asam urat 10 – 25 ppm berada dibawah kecepatan

maksimum reaksi enzimatik sehingga konsentrasi asam urat berbanding lurus dengan ΔE_{sel} .



Gambar 4.3. Kurva Hubungan antara Perubahan Potensial Sel Biosensor Asam Urat dengan Waktu

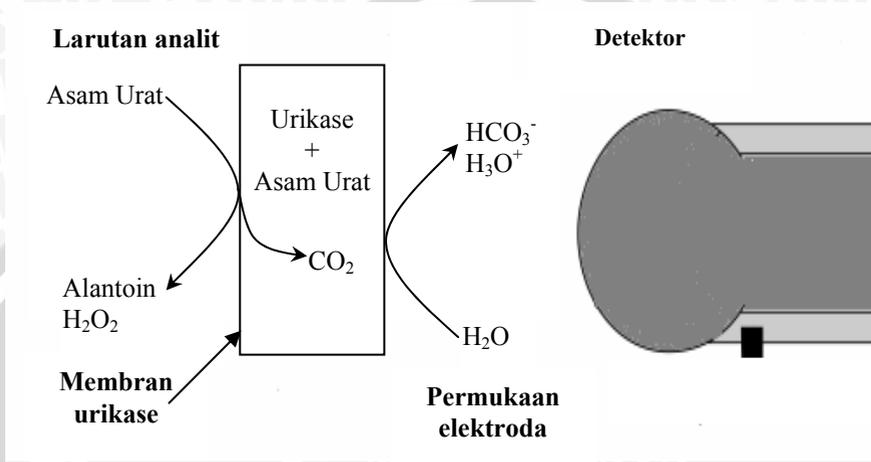
Waktu respon biosensor asam urat yang diperlukan adalah 270 detik (Gambar 4.3). Semua konsentrasi asam urat yang berada pada kisaran konsentrasi 10 ppm hingga 25 ppm telah memberikan potensial sel yang tetap setelah 270 detik. Dengan demikian, biosensor asam urat akan memberikan potensial yang tetap setelah 270 detik biosensor dicelupkan pada larutan asam urat.

4.3. Mekanisme Deteksi Biosensor Asam Urat

Berdasarkan pada karakter biosensor yang diperoleh maka dapat diperkirakan mekanisme kerja dari biosensor asam urat sesuai dengan Gambar 4.4 Hal ini dibuktikan pada pengukuran larutan asam urat dengan konsentrasi yang sama yaitu 10 ppm menggunakan jumlah urikase amobil yang berbeda.

Pada pengukuran dengan menggunakan jumlah urikase 2 mg mempunyai beda potensial sebesar 8 mV. Beda potensial mengalami kenaikan menjadi 10,3 mV pada jumlah urikase amobil 5,7 mg. Pada jumlah urikase amobil 8,7 mg mempunyai beda potensial 14,7 mV dan pada jumlah urikase 12,8 mV mempunyai nilai beda potensial 15 mV. Berdasarkan hal tersebut dapat diketahui bahwa apabila urikase amobil besar akan menyebabkan besarnya harga beda potensial sel. Hal ini menunjukkan bahwa perubahan H_3O^+ hasil aktivitas urikase terhadap asam urat terjadi pada permukaan elektroda. Oleh karena

itu, perubahan konsentrasi H_3O^+ terdeteksi oleh elektroda sebagai potensial sel.



Gambar 4.4. Mekanisme Deteksi Biosensor Asam Urat

Asam urat yang terdapat pada larutan akan terdifusi menuju permukaan elektroda melalui membran kitosan-urikase. Hal ini terjadi karena perbedaan konsentrasi asam urat pada permukaan elektroda dengan larutan sampel. Asam urat yang melewati membran akan mengalami oksidasi oleh adanya urikase. Hasil reaksi oksidasi asam urat adalah CO_2 yang terlarut dalam air menghasilkan H_3O^+ yang mengakibatkan perubahan pH pada permukaan elektroda. Perubahan pH ini dideteksi sebagai perubahan potensial oleh elektroda gelas.

BAB V

PENUTUP

5.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian diketahui bahwa jumlah urikase amobil berpengaruh terhadap kinerja biosensor. Apabila jumlah urikase amobil meningkat maka akan meningkatkan kinerja dari biosensor yang ditunjukkan dengan peningkatan bilangan Nernst. Akan tetapi, peningkatan jumlah urikase amobil lebih besar dari 12,8 mg akan menurunkan harga bilangan Nernst. Kinerja optimum biosensor dihasilkan pada urikase amobil 12,8 mg, pada kondisi tersebut harga bilangan Nernst 28,8 mV/dekade, kisaran konsentrasi 10 ppm hingga 25 ppm, batas deteksi 10,09 ppm, dan waktu respon adalah 270 detik.

5.2. Saran

Penelitian perlu dilakukan dengan menggunakan perbedaan konsentrasi asam urat yang lebar, dengan tujuan untuk dapat memperbesar perbedaan potensial sel yang terbaca oleh biosensor sehingga kepekaan meningkat. Disamping itu perlu dilakukan penelitian untuk menurunkan batas deteksi dengan meningkatkan kecepatan reaksi enzimatisnya yaitu melalui penambahan kofaktor.

DAFTAR PUSTAKA

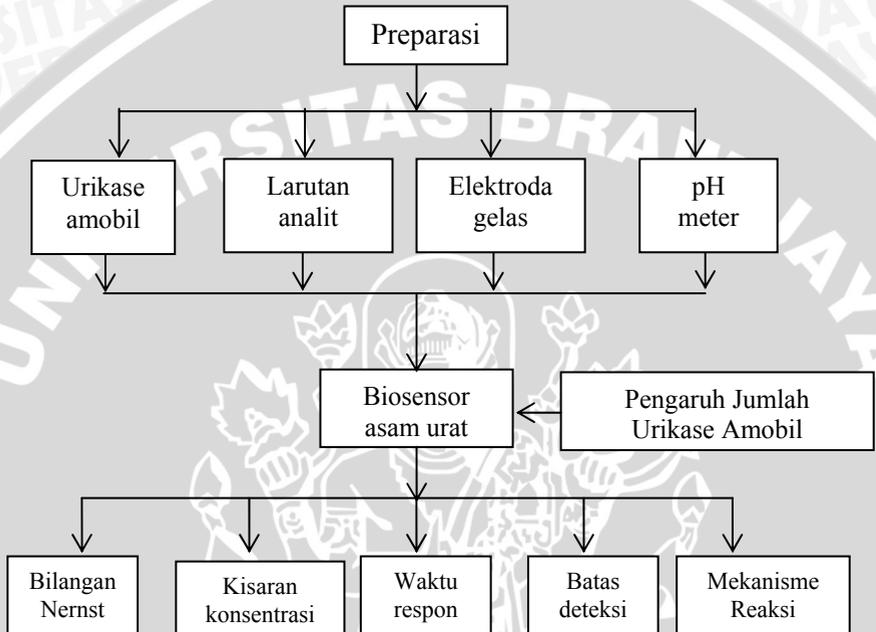
- Adeloju, S., 1999, Biosensing Technology, Centre for Electrochemical Research and Analytical Technology, www.biosens_tech.html, diakses pada tanggal 8 April 2007
- Andreescu, S., and Sadik, O.A., 2004, Trends And Challenges In Biochemical Sensors For Clinical And Environmental Monitoring, *Pure Appl. Chem.*; **76**, 861-878
- Bailey, P.L., 1983, **Analysis with Ion Selective Electrode**, Heyden dan Sons Ltd., London, hal. 20-24
- Catarow, A., dan Trumper, M., 1962, **Clinical Biochemistry**, W.B. Saunders Company, Philadelphia, hal. 519-520
- Chaplin, M., 2004, **Potentiometric Biosensors**, Faculty of Engineering, Science and The Built Environment, South Bank University, London, hal. 626
- Harris, 2000, **Analytical Chemistry**, Oxica Group, London, hal. 128-129
- 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 Diag of Typical Biosensor Mechanisms, Drug Discovery Development, www.dddmag.com, diakses pada tanggal 21 Agustus 2007, hal. 1-2
- Lehninger, A.L., 1991, **Dasar-dasar Biokimia**, Jilid I, Terjemahan Therawijaya, Erlangga, Jakarta, hal. 335-336
- Liao, C.W., Chou, J.C, Sun, T.P., Hsiung, S.K., and Hsieh, J.H., 2003, **Study on The Uric Acid Biosensor By The Potentiometric Principle**, Institute of Biomedical Engineering, Taiwan, hal. 1-10
- Magalhaes, J.M.C.S., dan Machado, A.A.S.C., 2002, Array of Potentiometric Sensors Of Creatinine In Urine Samples, *The Analyst*; **127**, 1069-1070

- Mahardika, 2007, **Amobilisasi Enzim Lipase dari *Mucor miehei* dalam Aluminosilikat Mesopori untuk Esterifikasi**, Skripsi, Jurusan Kimia Universitas Brawijaya, Malang, hal. 32
- Mayes, A.P., Martin, D.W., Granner, D.K., dan Rodwell, V.W., 1987, **Biokimia Harper**, Alih bahasa : Dr. Iyan Dharmawan, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta, hal. 90-95
- Minter, S., dan Tamara, K., 2006, Nanopore Engineering of Chytosan Polymer for Enzyme Immobilization and Stabilization, [http://www. Aiche.org.pdf](http://www.Aiche.org.pdf), hal 1-2
- Pijanowska, D.G., Dawgul, M., and Torbich, W., 2005, Comparison of Urea Determination in Biological Samples by Enfets Based on pH and pNH₄ Detection, *Sensors*; **2**, 160-161
- Rao, G., and Mulchandani, A., 2005, Biosensor Construction, www.jaist.ac.jp, diakses pada tanggal 29 April 2007, hal. 8-10
- Rawn, J.D, 1989, **Biochemistry**, Neil Patterson Publisher California Biological Supply Company, Barlington, Norntn California, hal. 654
- Sa'adah, B., 1996, **Karakterisasi Ekstrak Kasar Enzim Urikase Hasil Isolasi Dari *Candida utilis***, Skripsi, Jurusan Kimia Universitas Brawijaya, Malang, hal. 45
- Soepia, R.S., dan Lieshout, G.V., 1978, **Kimia Analisa**, Institut Teknologi Bandung, Bandung, hal. 123-126
- Turner, O.G., Karhade, and Chiluveru, S.S., 1987, **Analytical Chemistry: An Open Learning**, Rough Van Peer Co., USA, hal. 194
- Varley, H., 1980, **Practical Clinical Biochemistry**, Vol.1, William Heinemann Medical Books, Ltd., London, hal. 235
- Wang, J., 2001, **Analytical Electrochemistry**, 2nd Ed., John Willey and Sons, Inc., New York, hal. 175-189
- Wicaksono, D. H. B., 2000, **Biosensor Introduction**, Tokyo Institute Of Technology, Jepang, hal. 79-80

Lampiran 1

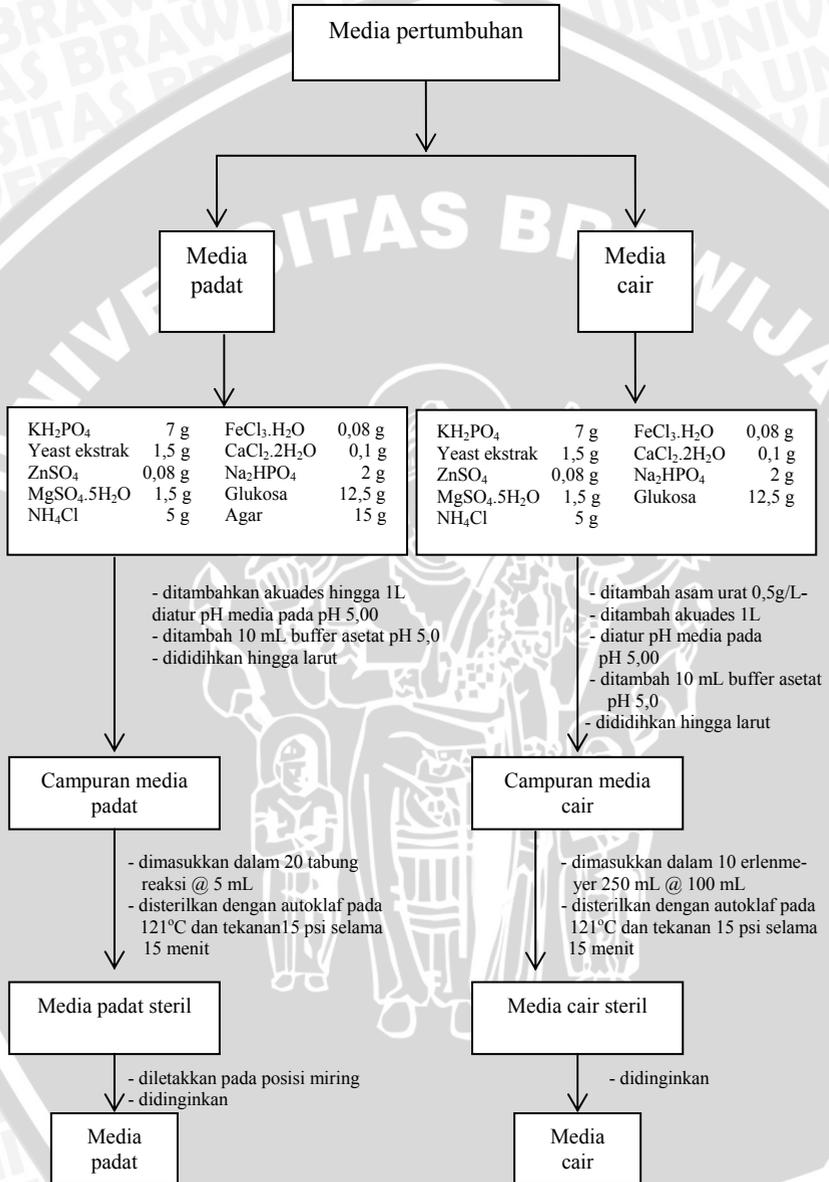
DIAGRAM ALIR METODE PENELITIAN

L.1.1. Diagram Alir Pembuatan Biosensor Asam Urat

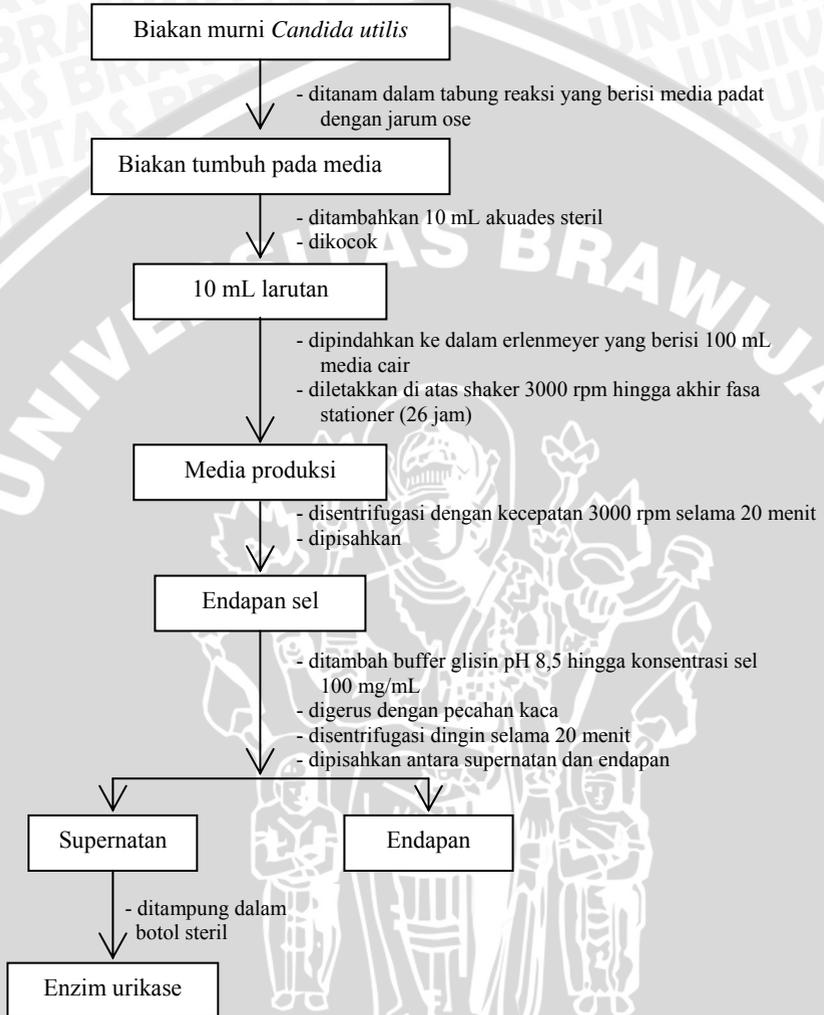


L.1.2. Pembuatan Urikase Amobil

L.1.2.1. Pembuatan Media Pertumbuhan



L.1.2.2. Isolasi Ekstrak Urikase dari *Candida utilis*



L.1.2.3. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Kasein

2 mL larutan kasein 5000 ppm

- ditambah 8 mL reagen Biuret
- ditambah 2 mL buffer glisin pH 8,5
- dikocok
- diinkubasi selama 30 menit pada temperatur 50 °C
- diukur absorbansinya pada panjang gelombang (λ) 460-650 nm
- dibuat grafik hubungan λ dengan absorbansi
- ditentukan λ maksimum

λ_{maks} kasein

L.1.2.4. Penentuan Kurva Baku Kasein

2 mL larutan kasein 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 ppm

- ditambah 8 mL reagen Biuret
- ditambah 2 mL *buffer* glisin pH 8,5
- dikocok
- diinkubasi selama 30 menit pada temperatur 50°C
- diukur absorbansinya pada λ_{maks}
- dibuat grafik hubungan absorbansi dan konsentrasi kasein

Kurva baku kasein

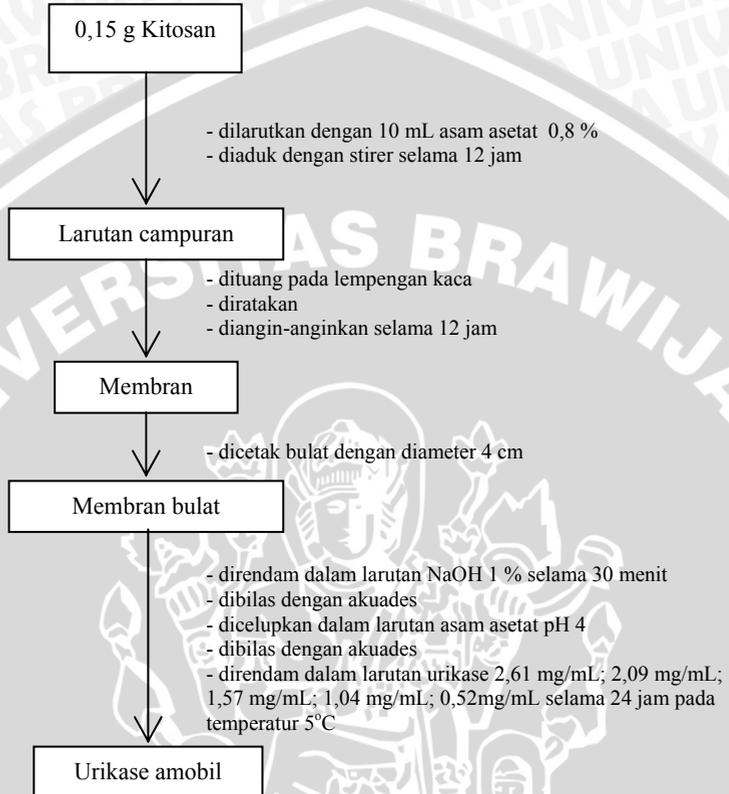
L.1.2.5. Penentuan Kadar Protein

2 mL urikase

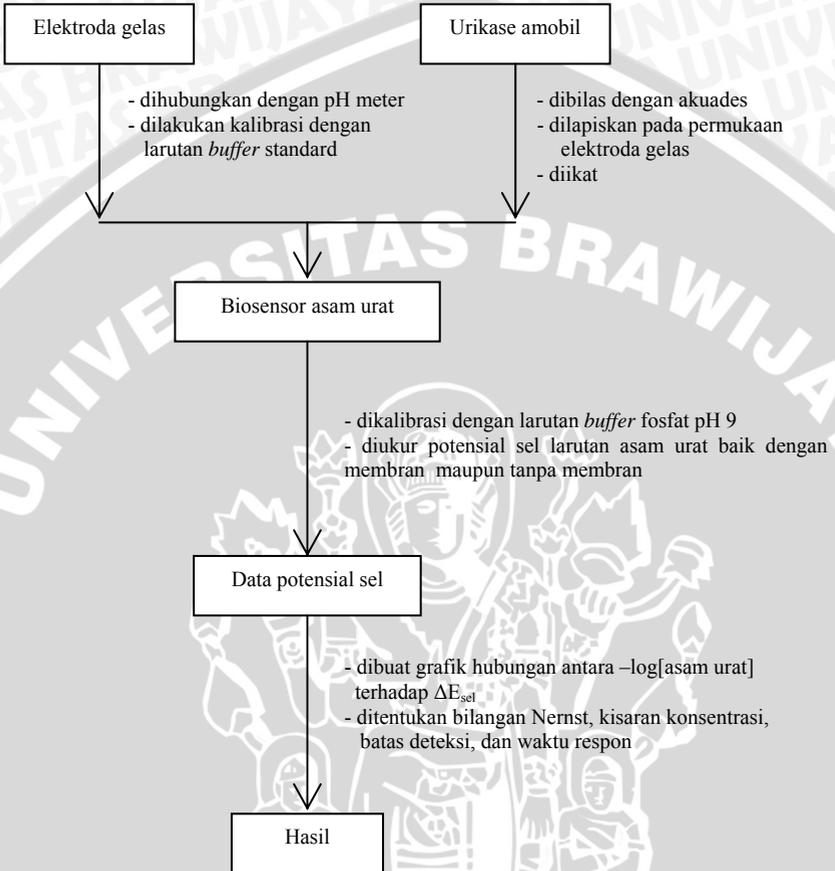
- ditambahkan 8 mL reagen Biuret
- ditambahkan 2 mL larutan kasein 5000 ppm
- dikocok
- diinkubasi pada temperatur 50°C selama 30 menit
- diukur absorbansinya pada λ_{maks}

Hasil

L.1.2.6. Amobilisasi Urikase



L.1.3. Karakteristik Biosensor Asam Urat



Lampiran 2

PEMBUATAN LARUTAN

L.2.1. Larutan Urikase

Konsentrasi urikase hasil isolasi dari *Candida utilis*: 2,612 mg/mL

Tabel L.2.1. Konsentrasi Urikase Hasil Pengenceran

Pengenceran	Volume Awal (mL)	Volume Akhir (mL)	C _{urikase} akhir (mg/mL)
80%	8	10	2,09
60%	6	10	1,57
40%	4	10	1,04
20%	2	10	0,52

Contoh perhitungan:

diencerkan 80%

Dipipet 8 mL kemudian diencerkan hingga 10 mL dengan aquadem.

$$\begin{aligned}[\text{Urikase}] &= 8/10 \times 2,612 \text{ mg/mL} \\ &= 2,0896 \text{ mg/mL}\end{aligned}$$

L.2.2. Larutan Na₂HPO₄ 0,2 M

Dalam pembuatan larutan Na₂HPO₄ 0,2 M sebanyak 500 mL, berat padatan yang diperlukan adalah:

$$\begin{aligned}\text{Berat Na}_2\text{HPO}_4 &= 142 \text{ g/mol} \times 0,2 \text{ mol/L} \times 0,5 \text{ L} \\ &= 14,2 \text{ g}\end{aligned}$$

Ditimbang 14,2 g padatan Na₂HPO₄, dilarutkan dengan akuades dalam gelas kimia 100 mL, selanjutnya dituang dalam labu ukur 500 mL dan diencerkan dengan akuades hingga tanda batas.

L.2.3. Larutan NaH₂PO₄ 0,2 M

Pada pembuatan 500 mL larutan NaH₂PO₄ 0,2 M, berat padatan NaH₂PO₄ 0,2 M yang harus ditimbang adalah:

$$\begin{aligned}\text{Berat NaH}_2\text{PO}_4 &= 120 \text{ g/mol} \times 0,2 \text{ mol/L} \times 0,5 \text{ L} \\ &= 12 \text{ g}\end{aligned}$$

Ditimbang 12,0 g padatan NaH₂PO₄ dilarutkan dengan akuades dalam gelas kimia 100 mL, dituang ke dalam labu ukur 500 mL kemudian diencerkan dengan akuades sampai tanda batas.

L.2.4. Larutan Buffer Fosfat

Larutan Buffer fosfat 0,2 M pH 9

$$\text{pH} = \text{pK}_{a_2} + \text{Log} \left(\frac{[\text{Garam}]}{[\text{Asam}]} \right)$$

$$\begin{aligned} \text{Log} \left(\frac{[\text{Garam}]}{[\text{Asam}]} \right) &= \text{pH} - \text{pK}_{a_2} \\ &= 9 - 7,21 = 1,79 \end{aligned}$$

$$9 = 7,21 + \log \frac{[\text{Na}_2\text{HPO}_4]}{[\text{NaH}_2\text{PO}_4]}$$

$$9 = 7,21 + \log a$$

$$\log a = 9 - 7,21 = 1,79$$

$$a = 61,6595$$

$$\frac{[\text{Na}_2\text{HPO}_4]}{[\text{NaH}_2\text{PO}_4]} = 61,6595$$

$$[\text{Na}_2\text{HPO}_4] = 61,6595 [\text{NaH}_2\text{PO}_4]$$

$$[\text{Na}_2\text{HPO}_4] = 61,6595 [\text{NaH}_2\text{PO}_4]$$

$$V_{\text{Na}_2\text{HPO}_4} = 61,6595 V_{\text{NaH}_2\text{PO}_4}$$

$$V_{\text{total}} = 62,6595 V_{\text{NaH}_2\text{PO}_4}$$

$$\bullet V_{\text{NaH}_2\text{PO}_4} = 1/(62,6595) \times 100 \text{ mL} = 1,6 \text{ mL}$$

$$\bullet V_{\text{Na}_2\text{HPO}_4} = 100 \text{ mL} - 1,6 \text{ mL} = 98,4 \text{ mL}$$

Pada pembuatan larutan *buffer* fosfat dengan pH 9 sebanyak 100 mL dilakukan pencampuran 1,6 mL larutan NaH_2PO_4 0,2 M dengan 98,4 mL larutan Na_2HPO_4 0,2 M sambil dilakukan pengadukan dan dengan menggunakan pH meter diatur pH larutan hingga 9.

L.2.5. Larutan Asam Aseat 0,1 M

Untuk membuat larutan CH_3COOH 0,2 M sebanyak 100 mL, yang diperlukan adalah:

$$\begin{aligned} \text{BJ} &= 1,05 \text{ kg/L} \\ &= 1,05 \cdot 10^3 \text{ g/L} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi asam asetat glasial} &= 1,05 \cdot 10^3 \text{ g/L} / 60 \text{ g/mol} \\ &= 17,5 \text{ M} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Volume } \text{CH}_3\text{COOH} &= 100 \text{ mL} \times \frac{0,1 \text{ M}}{17,5 \text{ M}} \\ &= 0,57 \text{ mL} \end{aligned}$$

Sebanyak 0,57 mL larutan asam asetat glasial dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, kemudian diencerkan sampai tanda batas sehingga diperoleh larutan asam asetat 0,1 M.

L.2.6. Larutan Asam Aseat pH 4,0

Larutan asam asetat pH 4,0 dapat dibuat dengan cara:

$$\text{pH} = - \log [\text{H}_3\text{O}^+]$$

$$4 = -\log [\text{H}_3\text{O}^+]$$

$$\log [\text{H}_3\text{O}^+] = -4$$

$$[\text{H}_3\text{O}^+] = 10^{-4} \text{ M}$$

$$10^{-4} \text{ M} = \sqrt{1,75 \cdot 10^{-5} \times [\text{CH}_3\text{COOH}]}$$

$$10^{-8} \text{ M} = 1,75 \cdot 10^{-5} \times [\text{CH}_3\text{COOH}]$$

$$[\text{CH}_3\text{COOH}] = 5,71 \cdot 10^{-4} \text{ M}$$

Volume larutan asam asetat 0,1 M yang diperlukan untuk membuat larutan asam asetat pH 4,0 adalah :

$$V \text{ CH}_3\text{COOH} = 100 \text{ mL} \times \frac{5,71 \cdot 10^{-4} \text{ mmol/mL}}{0,1 \text{ mmol/mL}}$$

$$V \text{ CH}_3\text{COOH} = 0,571 \text{ mL}$$

Untuk membuat larutan asam asetat 0,1 M pH 4,0 sebanyak 100 mL adalah dengan cara larutan asam asetat 0,1 M diambil sebanyak 0,571 mL dan dimasukkan dalam gelas kimia 250 mL dan ditambahkan akuades hingga 100 mL, kemudian diperiksa pH-nya dengan menggunakan pH meter.

L.2.7. Larutan NaOH 1 %

Untuk memperoleh larutan NaOH 1 % sebanyak 100 mL, maka massa padatan NaOH yang harus ditimbang adalah sebanyak 1 g kemudian dilarutkan dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL. Lalu ditambahkan akuades sampai tanda batas.

L.2.8. Larutan NaOH 0,1 M

Untuk memperoleh larutan NaOH 0,1 M sebanyak 100 mL, massa padatan NaOH yang harus ditimbang adalah :

$$\begin{aligned} \text{Massa NaOH} &= 0,1 \text{ mol/L} \times 0,1 \text{ L} \times 40 \text{ g/mol} \\ &= 0,4 \text{ g} \end{aligned}$$

Ditimbang 0,4 g padatan NaOH, dilarutkan dengan akuades dalam gelas kimia 100 mL, selanjutnya dituang dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan akuades hingga tanda batas.

L.2.9. Pembuatan Larutan Asam Urat Berbagai Konsentrasi

L.2.9.1 Larutan Asam Urat 100 ppm

Untuk memperoleh larutan asam urat 100 ppm sebanyak 1000 mL dapat dilakukan dengan cara ditimbang 0,1 g asam urat dan dimasukkan ke dalam gelas kimia 100 mL. Kemudian

ditambahkan tetes demi tetes larutan NaOH 0,1 M. Setelah larut sempurna dipindahkan dalam labu ukur 100 mL secara kuantitatif dan diencerkan dengan akuades sampai tanda batas.

L.2.9.1. Pembuatan Larutan Asam Urat 5, 10, 15, 20, 25 ppm

Larutan asam urat dengan konsentrasi 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm dibuat dari larutan asam urat 100 ppm dengan volume tertentu lalu diencerkan hingga 250 mL dengan menggunakan *buffer* fosfat pH 9. Volume yang harus dipipet disajikan pada Tabel L.2.2.

Tabel L.2.2. Pembuatan Larutan Asam Urat 5, 10, 15, 20, 25 ppm

C _{asam urat Akhir} (ppm)	Volume Akhir (mL)	Volume awal yang Dipipet (mL)
25	250	62,5
20	250	50
15	250	37,5
10	250	25
5	250	12,5

Contoh perhitungan pembuatan larutan asam urat 25 ppm hingga 5 ppm

* Pembuatan 250 mL larutan asam urat 25 ppm dari 100 ppm

$$\begin{aligned} \text{Volume asam urat 100 ppm} &= 250 \text{ mL} \times \frac{25 \text{ mg/L}}{100 \text{ mg/L}} \\ &= 62,5 \text{ mL} \end{aligned}$$

Jadi, volume larutan asam urat 100 ppm yang harus dipipet untuk pembuatan 250 mL larutan asam urat 25 ppm adalah 62,5 mL.

L.2.10. Larutan Asam Asetat 0,8 %

Dalam pembuatan larutan CH₃COOH 0,8 % sebanyak 100 mL dilakukan dengan cara dipipet 0,8 mL larutan asam asetat glasial kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL. Setelah itu diencerkan sampai tanda batas sehingga diperoleh larutan asam asetat 0,8 %.

Larutan asam asetat 0,8 % mempunyai pH :

$$\begin{aligned} [\text{CH}_3\text{COOH}] &= \frac{10 \times \text{Kadar} \times \text{BJ}}{\text{BM}} \\ &= \frac{10 \times 0,8 \times 8,4 \cdot 10^{-3} \text{ g/L}}{60 \text{ g/mol}} \\ &= 1,12 \cdot 10^{-3} \text{ M} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 [\text{H}_3\text{O}^+] &= \sqrt{1,75 \cdot 10^{-5} \times 1,12 \cdot 10^{-3} \text{ M}} \\
 &= 1,4 \cdot 10^{-4} \text{ M} \\
 \text{pH} &= -\log [\text{H}_3\text{O}^+] \\
 &= -\log 1,4 \cdot 10^{-4} = 3,8
 \end{aligned}$$

L.2.11. Larutan Asam Asetat 0,2 M

Untuk membuat larutan CH_3COOH 0,2 M sebanyak 100 mL, yang diperlukan adalah:

$$\begin{aligned}
 \text{BJ} &= 1,05 \text{ kg/L} \\
 &= 1,05 \cdot 10^3 \text{ g/L}
 \end{aligned}$$

$$\text{Konsentrasi asam asetat} = 1,05 \cdot 10^3 \text{ g/L} / 60 \text{ g/mol} = 17,5 \text{ M}$$

$$\text{Volume } \text{CH}_3\text{COOH} = 100 \text{ mL} \times \frac{0,2}{17,5} = 1,15 \text{ mL}$$

Diambil 1,15 mL asam asetat dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL, kemudian diencerkan sampai tanda batas sehingga diperoleh larutan asam asetat 0,2 M.

L.2.12. Larutan Natrium Asetat 0,2 M

$$\text{BM Na-asetat} = 82,0 \text{ g/mol}$$

Untuk mendapatkan konsentrasi Na-asetat 0,2 M sebanyak 100 mL, massa Na-asetat yang harus ditimbang adalah :

$$\begin{aligned}
 \text{Massa Na-asetat} &= 0,2 \text{ mol/L} \times 0,1 \text{ L} \times 82 \text{ g/mol} \\
 &= 1,64 \text{ g}
 \end{aligned}$$

Ditimbang 1,64 g Na-asetat dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian diencerkan dengan akuades sampai tanda batas sehingga diperoleh larutan Na-asetat 0,2 M.

L.2.13. Larutan *Buffer* Asetat pH 5,00

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \text{Log} \left(\frac{[\text{Garam}]}{[\text{Asam}]} \right)$$

$$\begin{aligned}
 \text{Log} \left(\frac{[\text{Garam}]}{[\text{Asam}]} \right) &= \text{pH} - \text{pK}_a \\
 &= 5 - 4,76 = 0,24
 \end{aligned}$$

$$\text{Log} \left(\frac{[\text{CH}_3\text{COONa}]}{[\text{CH}_3\text{COOH}]} \right) = 0,24$$

$$\frac{[\text{CH}_3\text{COONa}]}{[\text{CH}_3\text{COOH}]} = 1,7378$$

$$[\text{CH}_3\text{COOH}]$$

$$[\text{CH}_3\text{COONa}] = 1,7378 [\text{CH}_3\text{COOH}]$$

$$\frac{C_{\text{CH}_3\text{COONa}} \times V_{\text{CH}_3\text{COONa}}}{V_{\text{Total}}} = 1,7378 \frac{C_{\text{CH}_3\text{COOH}} \times V_{\text{CH}_3\text{COOH}}}{V_{\text{Total}}}$$

$$V_{\text{CH}_3\text{COONa}} = 1,7378 V_{\text{CH}_3\text{COOH}}$$

$$V_{\text{total}} = 2,7378 \text{ V } \text{CH}_3\text{COOH}$$

- $V \text{CH}_3\text{COOH} = 1/(2,7378) \times 50 \text{ mL} = 18,3 \text{ mL}$

- $V \text{CH}_3\text{COONa} = 50 \text{ mL} - 18,3 \text{ mL} = 31,7 \text{ mL}$

Larutan *buffer* asetat 0,2 M dengan pH 5,0 sebanyak 50 mL dapat dibuat dengan mencampurkan 18,3 mL larutan CH_3COOH 0,2 M dengan 31,7 mL larutan CH_3COONa 0,2 M sambil dilakukan pengadukan dan diperiksa pH-nya dengan menggunakan pH meter.

L.2.14. Larutan Glisin 1 M

$$\text{BM Glisin} = 75 \text{ g/mol}$$

Untuk memperoleh larutan glisin 1 M sebanyak 50 mL, maka massa glisin yang harus ditimbang adalah :

$$\begin{aligned} \text{Massa glisin} &= 1 \text{ mol/L} \times 0,05 \text{ L} \times 75 \text{ g/mol} \\ &= 3,75 \text{ g} \end{aligned}$$

Ditimbang 3,75 g glisin dan dimasukkan ke dalam gelas kimia 50 mL kemudian ditambahkan sedikit demi sedikit akuades sambil diaduk hingga larut. Selanjutnya dipindahkan secara kuantitatif dalam labu ukur 50 mL dan diencerkan dengan akuades sampai tanda batas sehingga diperoleh larutan glisin 1 M.

L.2.15. Larutan Buffer Glisin pH 8,5

$$\text{pH} = 8,5$$

$$[\text{H}^+] = 3,16 \cdot 10^{-9} \text{ M}$$

$$[\text{H}^+] = \text{Ka} \cdot \frac{\text{mmol Asam}}{\text{mmol Garam}}$$

$$3,16 \cdot 10^{-9} = 1,6 \cdot 10^{-10} \cdot \frac{(25-0,1\text{p})}{0,1 \text{ p}}$$

$$\begin{aligned} 3,32 \cdot 10^{-10} \text{ p} &= 4 \cdot 10^{-9} \\ \text{p} &= 12,05 \text{ mL} \end{aligned}$$

Untuk membuat larutan *buffer* glisin pH 8,5 dapat dibuat dengan cara dipipet 25 mL larutan glisin 1 M dan ditambahkan dengan 12,05 mL larutan NaOH 0,1 M sambil dilakukan pengadukan dan diperiksa pH-nya dengan menggunakan pH meter.

L.2.16. Pembuatan Reagen Biuret

Reagen biuret dibuat dengan cara menimbang 0,15 g CuSO_4 dan natrium tartrat 0,6 g. Kemudian dilarutkan dengan akuades

dalam gelas kimia sambil diaduk dengan pengaduk gelas hingga larut semua, ditambah 30 mL NaOH 10% dan dituangkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan akuades sampai tanda batas.

L.2.17. Larutan Kasein 10000 ppm

Larutan kasein 10000 ppm dapat dibuat dengan cara ditimbang kasein sebanyak 1 g, kemudian dilarutkan dengan 50 mL akuades dalam gelas kimia dengan penambahan NaOH 0,1 M tetes demi tetes hingga larut. Kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambah akuades hingga tanda batas, dikocok sampai homogen, sehingga diperoleh larutan kasein 10000 ppm.

L.2.18. Larutan Baku Kasein

Disiapkan 5 buah labu takar 10 mL, diisi dengan larutan kasein 10000 ppm, masing-masing sebanyak 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; dan 9 mL. Kemudian diencerkan dengan akuades sampai tanda batas, sehingga diperoleh larutan kasein dengan konsentrasi masing-masing adalah 1000; 2000; 3000; 4000; 5000; 6000; 7000; 8000; dan 9000 ppm.

Lampiran 3

ISOLASI URIKASE DARI *Candida utilis*

L.3.1. Pembuatan Media Padat

Pembuatan media padat untuk mengkultivasi biakan murni *Candida utilis* diperlukan media dengan komposisi sebagai berikut:

- KH_2PO_4 7,0g;
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,08g;
- NH_4Cl 5,0g;
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1g;
- Na_2HPO_4 2,0g;
- Yeast ekstrak 1,5g;
- $\text{MgSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1,5g;
- Agar 15,0g;
- $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,08g;
- glukosa 12,5g.

Bahan tersebut ditambah akuades sampai 1000 mL dan media diatur pH 5 dengan menambahkan larutan asam asetat 0,2 M dan untuk mempertahankan pH larutan ditambah 10 mL *buffer* asetat pH 5 tiap 1000 mL media. Kemudian bahan tersebut dilarutkan dengan cara dididihkan. Larutan dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 mL dan ditutup dengan kapas. Selanjutnya disterilkan dalam autoclave pada temperatur 121°C , tekanan 15 psi selama 15 menit. Setelah autoklaf dibuka, tabung reaksi diletakkan pada posisi miring dalam keadaan panas.

L.3.2. Pembuatan Media Cair

Media cair untuk pertumbuhan *Candida utilis* mempunyai komposisi sama dengan komposisi media padat, tetapi pada media cair tanpa dilakukan penambahan agar dan perlu ditambahkan asam urat 0,5 g/L sebagai induser. Penambahan asam urat akan meningkatkan produksi urikase pada *Candida utilis*. Bahan-bahan tersebut ditambah akuades 1000 mL dan pH media diatur pada 5 dengan menambahkan larutan asam asetat 0,2 M dan untuk mempertahankan pH larutan ditambahkan 10 mL *buffer* asetat pH 5 tiap 1000 mL

media. Kemudian bahan dilarutkan dengan mendidihkannya. Selanjutnya dimasukkan ke dalam erlenmeyer.

L.3.3. Penanaman Biakan Murni

Satu mata ose dari biakan murni *Candida utilis* ditanam pada media agar miring dan untuk menghindari kontaminasi dari luar, maka mulut tabung reaksi dan jarum ose disterilkan dengan pembakar spiritus.

L.3.4. Isolasi Enzim

Dimasukkan 500 mL media cair ke dalam 5 erlenmeyer 250 mL, masing-masing erlenmeyer berisi 100 mL media cair, kemudian disterilisasi dengan autoclave pada temperatur 121°C, tekanan 15 psi selama 15 menit. Setelah didinginkan pada masing-masing erlenmeyer ditanam satu tabung biakan murni *Candida utilis*, caranya satu tabung biakan murni *Candida utilis* ditambah 10 mL akuades steril kemudian dikocok dan ditanam dalam media cair. Penambahan dilakukan secara aseptis, kemudian kelima erlenmeyer tersebut ditempatkan dalam shaker pada temperatur kamar dan diinkubasi sampai mencapai awal fase stasioner (setelah waktu 26 jam).

L.3.5. Ekstraksi Urikase

Setelah medium fermentasi mencapai awal fase stasioner yaitu setelah 26 jam, kemudian dilakukan ekstraksi enzim urikase, dan caranya adalah sebagai berikut: pertama dilakukan pemisahan sel dengan sentrifugasi pada 3000 rpm selama 20 menit. Kemudian endapan sel ditambah *buffer* glisin pH 8,5 sehingga didapatkan konsentrasi sel sekitar 100 mg/mL. Pengeluaran enzim dari sel dapat dilakukan dengan cara digerus memakai pecahan kaca lalu disentrifuge dingin selama 20 menit. Kemudian supernatan dan endapan dipisahkan. Supernatan yang diperoleh merupakan enzim urikase.

L.3.6. Penentuan Kadar Protein

Penentuan kadar protein urikase murni ditentukan dengan metode biuret, dengan cara 2 mL larutan enzim ditambah 8 mL reagen biuret dan ditambah lagi dengan 2 mL larutan

buffer glisin pH 8,5. Kemudian dikocok dan didiamkan selama 30 menit pada temperatur kamar. Setelah itu diukur serapannya dengan UV-VIS pada panjang gelombang maksimum. Sebagai blanko dipipet 2 mL air, ditambahkan 8 mL reagen biuret, dan ditambahkan dengan 2 mL *buffer* glisin pH 8,5 selanjutnya perlakuan sama seperti diatas. Untuk menentukan konsentrasi protein enzim digunakan kurva standar kasein. Konsentrasi protein enzim ditentukan dengan mengkonversikan absorbansi dengan kurva baku kasein.



Lampiran 4

PENENTUAN KADAR PROTEIN

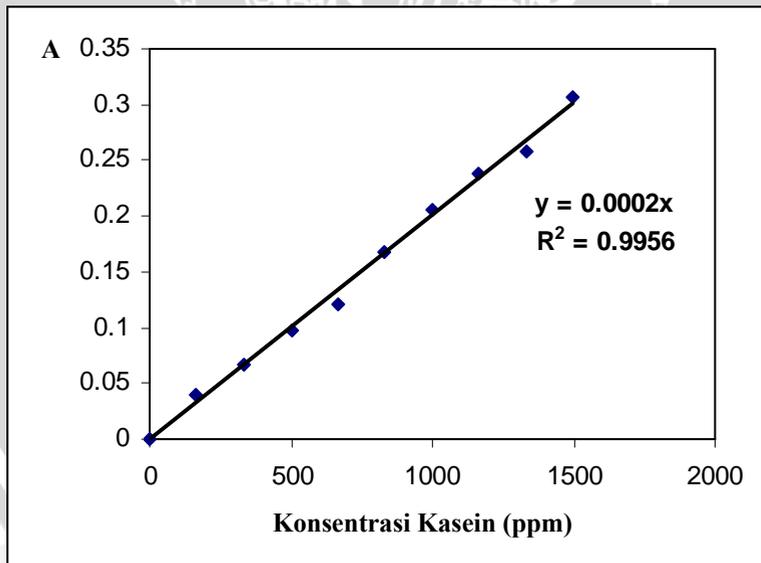
L.4.1. Penentuan λ_{maks} Kasein

Kasein 833,333 ppm, $\lambda_{\text{maks}} = 544,5 \text{ nm}$, Abs=0,176

L.4.2. Kurva Baku Kasein

Tabel L.4.1. Absorbansi Kasein pada $\lambda_{\text{maks}} = 544,5 \text{ nm}$

C_{kasein} (ppm)	A_1	A_2	A_3	A (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.4.1. Kurva Baku Kasein

L.4.3. Penentuan Kadar Protein

Kadar protein urikase ditentukan melalui konversi nilai absorbansi urikase pada kurva baku kasein.

Diketahui persamaan regresi kasein :

$$Y = 2.10^{-4} X$$

Volume enzim yang digunakan untuk penentuan = 2 mL

Volume larutan standar kasein 5000 ppm yang ditambahkan = 2 mL

Volume larutan yang diukur absorbansinya = 12 mL

$$2 \text{ mL} \times 5000 \text{ ppm} = 12 \text{ mL} \times C_2$$

$$C_2 = 833,333 \text{ ppm}$$

Konsentrasi total =

konsentrasi protein enzim + konsentrasi kasein

Contoh Perhitungan :

Perhitungan kadar protein dengan absorbansi 0,2529 adalah :

$$Y = 2.10^{-4} X$$

$$0,2529 = 2.10^{-4} X$$

$$X = 1264,5 \text{ ppm (konsentrasi protein enzim total)}$$

Maka konsentrasi enzim = konsentrasi protein total – konsentrasi

kasein yang ditambahkan

$$= 1264,5 \text{ ppm} - 833,333 \text{ ppm}$$

$$= 431,167 \text{ ppm}$$

$$= 0,431 \text{ mg/mL}$$

$$\text{Jadi, kadar enzim} = 0,431 \text{ mg/mL} \times 12 \text{ mL} / 2 \text{ mL}$$

$$= 2,587 \text{ mg/mL}$$

Tabel L.4.2. Kadar Protein Urikase

Absorbansi			C _{protein} (mg/mL)			Rerata
A ₁	A ₂	A ₃	1	2	3	C _{protein}
0,2529	0,2548	0,2535	2,587	2,644	2,605	2,612

Tabel L.4.3. Jumlah Urikase yang Teramobilkan

No	Absorbansi		$C_{\text{protein sisa}}$ (mg/mL)	$C_{\text{protein awal}}$ (mg/mL)	Protein teramobilkan mg
	A ₁	A ₂			
1	0,1960	0,1970	0,895	2,612	17,2
2	0,2100	0,2118	1,3274	2,0896	12,8
3	0,2239	0,2253	1,7418	1,5672	8,7
4	0,2340	0,2354	2,0422	1,0448	5,7
5	0,2460	0,2482	2,4116	0,5224	2,0

$$C_{\text{protein yang teramobilkan}} = (C_{\text{protein awal}} - C_{\text{protein sisa}}) \times 10 \text{ mL}$$



Lampiran 5

DATA HASIL PENELITIAN

L.5.1. Data Hasil Pengukuran

Tabel L.5.1. Data Hasil Pengukuran Potensial pada Berbagai Jumlah Urikase Amobil

Urikase amobil = 17,2 mg

C _{Asam urat} (ppm)	[Asam Urat] (M)	-log [Asam urat]	E _{tanpa urikase} (mV)	E _{dengan urikase} (mV)	ΔE _{tanpa urikase} (mV)	E _{tanpa urikase} (mV)	E _{dengan urikase} (mV)	ΔE _{tanpa urikase} (mV)	E _{tanpa urikase} (mV)	E _{dengan urikase} (mV)	ΔE _{tanpa urikase} (mV)	ΔE _{tanpa urikase} rata (mV)
5	2,97E-05	4,53	-76	-66	10	-65	-64	1	-68	-66	2	4,33
10	5,95E-05	4,23	-88	-72	16	-73	-63	10	-72	-64	8	11,33
15	8,92E-05	4,05	-88	-75	13	-70	-63	7	-74	-68	6	8,67
20	1,19E-04	3,92	-87	-76	11	-74	-69	5	-74	-69	5	7,00
25	1,49E-04	3,83	-86	-76	10	-73	-71	2	-71	-69	2	4,67

Urikase amobil = 12,8 mg

C _{Asam urat} (ppm)	[Asam Urat] (M)	-log [Asam urat]	E _{tanpa urikase} (mV)	E _{dengan urikase} (mV)	ΔE _{tanpa urikase} (mV)	E _{tanpa urikase} (mV)	E _{dengan urikase} (mV)	ΔE _{tanpa urikase} (mV)	E _{tanpa urikase} (mV)	E _{dengan urikase} (mV)	ΔE _{tanpa urikase} (mV)	ΔE _{tanpa urikase} rata (mV)
5	2,97E-05	4,53	-81	-73	8	-68	-58	10	-66	-64	2	6,67
10	5,95E-05	4,23	-92	-80	12	-78	-61	17	-79	-63	16	15,00
15	8,92E-05	4,05	-90	-83	7	-79	-67	12	-79	-67	12	10,33
20	1,19E-04	3,92	-88	-85	3	-77	-68	9	-75	-66	9	7,00
25	1,49E-04	3,83	-86	-85	1	-74	-69	5	-71	-67	4	3,33

Urikase amobil = 8,7 mg

C _{Asam urat} (ppm)	[Asam Urat] (M)	-log [Asam urat]	E _{tanpa urikase} (mV)	E _{dengan urikase} (mV)	ΔE _{tanpa urikase} (mV)	E _{tanpa urikase} (mV)	E _{dengan urikase} (mV)	ΔE _{tanpa urikase} (mV)	E _{tanpa urikase} (mV)	E _{dengan urikase} (mV)	ΔE _{tanpa urikase} (mV)	ΔE _{tanpa urikase} rata (mV)
5	2,97E-05	4,53	-94	-87	7	-79	-70	9	-79	-64	15	13,67
10	5,95E-05	4,23	-102	-86	16	-86	-77	10	-86	-68	18	14,67
15	8,92E-05	4,05	-99	-89	10	-85	-77	8	-85	-69	16	11,33
20	1,19E-04	3,92	-96	-88	8	-83	-78	5	-83	-69	14	9,00
25	1,49E-04	3,83	-93	-87	6	-74	-73	1	-74	-68	6	4,33

Urikase anobil = 5,7 mg

[A: C _{Asam Urat} (ppm)]	[Asam Urat] (M)	-log [Asam urat]	E _{ur} Tanpa urikase (mV)	E _{ur} Dengan Urikase (mV)	ΔE _{ur} (mV)	E _{ur} Tanpa urikase (mV)	E _{ur} Dengan Urikase (mV)	ΔE _{ur} (mV)	E _{ur} Tanpa urikase (mV)	E _{ur} Dengan Urikase (mV)	ΔE _{ur} (mV)	ΔE _{ur} Rata-rata (mV)
5	2.97E-05	4.53	-89	-83	6	-71	-67	4	-67	-65	2	4.00
10	5.95E-05	4.23	-98	-90	8	-78	-69	11	-76	-64	12	10.33
15	8.92E-05	4.05	-98	-91	7	-82	-74	8	-76	-66	10	8.33
20	1.19E-04	3.92	-96	-90	6	-81	-77	4	-75	-68	7	5.67
25	1.49E-04	3.83	-92	-89	3	-81	-78	3	-78	-69	8	4.67

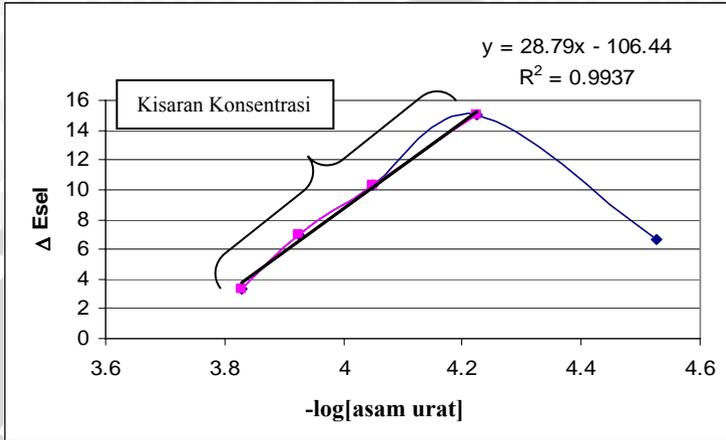
Urikase anobil = 2,0 mg

[A: C _{Asam Urat} (ppm)]	[Asam Urat] (M)	-log [Asam urat]	E _{ur} Tanpa urikase (mV)	E _{ur} Dengan Urikase (mV)	ΔE _{ur} (mV)	E _{ur} Tanpa urikase (mV)	E _{ur} Dengan Urikase (mV)	ΔE _{ur} (mV)	E _{ur} Tanpa urikase (mV)	E _{ur} Dengan Urikase (mV)	ΔE _{ur} (mV)	ΔE _{ur} Rata-rata (mV)
5	2.97E-05	4.53	-89	-80	9	-78	-68	10	-75	-72	3	7.33
10	5.95E-05	4.23	-99	-84	15	-80	-69	11	-75	-70	5	10.33
15	8.92E-05	4.05	-98	-85	13	-85	-75	11	-81	-78	3	9.00
20	1.19E-04	3.92	-95	-87	8	-84	-77	7	-83	-79	4	6.33
25	1.49E-04	3.83	-92	-86	6	-82	-79	3	-81	-79	2	3.67

Tabel L.5.2. Data Hasil Pengukuran Waktu Respon Pada setiap Konsentrasi Asam Urat

Waktu (s)	10ppm			15ppm			20ppm			25ppm		
	E_{cat} Tanpa urikase (mV)	E_{cat} Dengan Urikase (mV)	ΔE_{cat} (mV)	E_{cat} Tanpa urikase (mV)	E_{cat} Dengan Urikase (mV)	ΔE_{cat} (mV)	E_{cat} Tanpa urikase (mV)	E_{cat} Dengan Urikase (mV)	ΔE_{cat} (mV)	E_{cat} Tanpa urikase (mV)	E_{cat} Dengan Urikase (mV)	ΔE_{cat} (mV)
	0	-49	-31	18	-50	-39	11	-59	-44	15	-53	-48
30	-60	-49	11	-62	-53	9	-70	-56	14	-62	-58	4
60	-63	-52	11	-64	-55	9	-72	-59	13	-64	-61	3
90	-63	-53	10	-65	-56	9	-73	-60	13	-65	-62	3
120	-63	-54	9	-65	-57	8	-73	-61	12	-65	-62	3
150	-63	-54	9	-65	-57	8	-73	-61	12	-65	-62	3
180	-63	-55	8	-65	-57	8	-73	-62	11	-65	-62	3
210	-63	-55	8	-65	-57	8	-73	-63	10	-65	-62	3
240	-63	-55	8	-65	-58	7	-73	-63	10	-65	-62	3
270	-63	-56	7	-65	-58	7	-73	-63	10	-65	-62	3
300	-63	-56	7	-65	-58	7	-73	-63	10	-65	-62	3
330	-63	-56	7	-65	-58	7	-73	-63	10	-65	-62	3
360	-63	-56	7	-65	-58	7	-73	-63	10	-65	-62	3

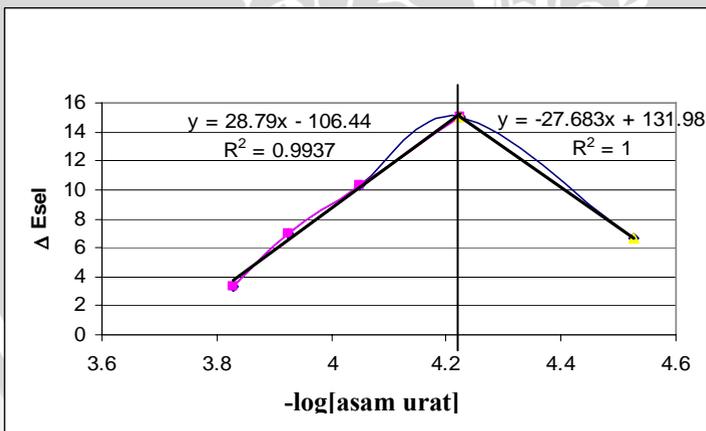
L.5.2. Contoh Penentuan Parameter Kinerja Biosensor



Gambar L.5.2. Kurva Hubungan ΔE_{sel} dengan $-\log [\text{Asam Urat}]$ pada Masing-masing Jumlah Urikase

Berdasarkan data di atas maka besarnya bilangan Nernst adalah sesuai dengan persamaan $y = ax + b$, yang mana harga bilangan Nernst sesuai dengan harga a. Jadi, harga bilangan Nernst adalah 28,8 mV/dekade. Dan kisaran konsentrasi adalah sebesar 10 ppm hingga 25 ppm.

Penentuan batas deteksi



Gambar L.5.3. Kurva Hubungan ΔE_{sel} dengan $-\log[\text{asam urat}]$

$$\begin{aligned}
 28,79x - 106,44 &= -27,683x + 131,98 \\
 (28,79 + 27,689)x &= 131,98 + 106,44 \\
 x &= 4,22 \\
 -\log p &= 4,22 \\
 p &= 6,0 \cdot 10^{-5} \text{ M} \\
 p &= 6,0 \cdot 10^{-5} \times 168,122 \times 1000 \\
 &= 10,09 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

Tabel L.5.3. Data Kemampuan Mungubah Asam Urat Maksimum

Urikase Amobil (mg)	C _{urikase} total (mg/mL)	Kemampuan mengubah asam urat maksimum (mg/menit)
17,2	2,612	0,35
12,8	2,612	0,26
8,7	2,612	0,18
5,7	2,612	0,11
2,0	2,612	0,04

Contoh Perhitungan

Untuk konsentrasi urikase amobil 1,72 mg/mL

Aktivitas urikase = 0,3126 unit (μmol/mL.menit)

Aktivitas spesifik = 0,3126 / 2,612

= 0,12 μmol/mg.menit

Jumlah urikase dalam 10 mL

= 1,72 mg/mL x 10 mL

= 17,2 mg

Asam urat yang dapat diubah

= 0,12 μmol/mg.menit x 17,2 mg

= 2,06 μmol/menit

= 2,06 μmol/menit x 168,122 μg/μmol

= 346,07 μg/menit

= 0,35 mg/menit

Tabel L.5.4. Data Pengukuran Ketebalan Membran Kitosan Menggunakan Mikrometer Sekrup

Massa Kitosan (g)	Pengukuran Ke-1 (mm)	Pengukuran Ke-2 (mm)	Pengukuran Ke-3 (mm)	Rata-rata (mm)	Rata-rata (μm)
0,15	0,0107	0,0104	0,0104	0,0105	10,5