

**PENGARUH KETEBALAN MEMBRAN KITOSAN
TERHADAP KINERJA BIOSENSOR POTENSIOMETRI
UREA**

SKRIPSI

Oleh :

NININ RIYA PUSPITASARI

0510920044-92



JURUSAN KIMIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2009

KINERJA BIOSENSOR POTENSIOMETRI UREA

SKRIPSI

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

Oleh :

NININ RIYA PUSPITASARI
0510920044-92



JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2009

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**PENGARUH KETEBALAN MEMBRAN KITOSAN TERHADAP
KINERJA BIOSENSOR POTENSIOMETRI UREA**

oleh :

NININ RIYA PUSPITASARI
0510920044-92

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

Dra. Anna Roosdiana, M.App.Sc
NIP. 132 000 070

Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Dr. Sasangka Prasetyawan, MS
NIP. 131 653 134

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini :

Nama : Ninin Riya Puspitasari

NIM : 0510920044-92

Jurusan : Kimia

Penulis skripsi berjudul :

”Pengaruh Ketebalan Membran Kitosan Terhadap Kinerja Biosensor Potensiometri Urea”

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari tugas akhir yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termasuk di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam tugas akhir ini.
2. Apabila di kemudian hari ternyata tugas akhir 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, 15 Januari 2009

Yang menyatakan,

(Ninin Riya Puspitasari)

NIM. 0510920044-92

PENGARUH KETEBALAN MEMBRAN KITOSAN TERHADAP KINERJA BIOSENSOR POTENSIOMETRI UREA

ABSTRAK

Urea di dalam air terhidrolisis oleh urease menjadi NH_3 dan CO_2 . Hasil reaksi tersebut dapat menimbulkan perubahan pH larutan, sehingga dapat digunakan sebagai dasar pembuatan biosensor potensiometri urea dengan transduser sensor H_3O^+ . Jumlah CO_2 dan NH_3 yang dihasilkan dipengaruhi oleh jumlah urease. Biosensor potensiometri urea dirancang dengan melapisi elektroda gelas menggunakan urease yang diamobilisasi pada membran kitosan. Jumlah urease amobil tergantung pada ketebalan membran kitosan. Dengan demikian, pada penelitian ini dipelajari pengaruh ketebalan membran kitosan terhadap kinerja biosensor potensiometri urea. Kinerja biosensor potensiometri urea ditunjukkan oleh bilangan Nernst, kisaran konsentrasi, batas deteksi dan waktu respon. Ketebalan membran kitosan yang dipelajari adalah 0,21 mm; 0,31 mm; 0,36 mm; 0,43 mm; dan 0,46 mm. Amobilisasi urease pada membran kitosan dilakukan pada pH 8, sedangkan pengukuran dilakukan pada pH 7,3. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ketebalan membran kitosan berpengaruh terhadap jumlah urease yang teramobilkan dan kinerja biosensor. Peningkatan ketebalan membran kitosan dapat memperbesar jumlah enzim yang teramobilkan, akan tetapi menurunkan kinerja biosensor. Kinerja biosensor optimum dicapai pada ketebalan membran 0,21 mm. Biosensor ini memiliki bilangan Nernst sebesar 28,47 mV/dekade, kisaran konsentrasi urea yang dapat diukur adalah 0,06 ppm hingga 6 ppm dan batas deteksi 0,073 ppm. Biosensor urea memiliki waktu respon 280 detik, efisiensi pengukuran 32 kali dan ketepatan pengukuran 96% hingga 98%.

THE INFLUENCE OF THE CHITOSAN MEMBRANE THICKNESS TO THE PERFORMANCE OF POTENTIOMETRIC UREA BIOSENSOR

ABSTRACT

In the water, urea is hydrolyzed by urease to form NH_3 and CO_2 . Product of this reaction will change the pH of solution. Therefore, it is possible to make a potentiometric urea biosensor using H_3O^+ sensitive electrode as transducer. The amount of CO_2 and NH_3 are affected by the amount of immobilized enzyme. Urea biosensor can be made by coating the surface of the glass electrode with urease that immobilized in chitosan. The amount of immobilized enzyme depends on chitosan membrane thickness. This research is to study about the influence of the chitosan membrane thickness to the performance of potentiometric urea biosensor. The performance of potentiometric urea biosensor are showed by characteristics such as Nernstian factor, concentration range, detection limit and response time. In this research, the optimization of immobilized urease chitosan membrane thickness was studied within various thicknesses of 0.21 mm; 0.31 mm; 0.36 mm; 0.43 mm; and 0.46 mm. The pH of urease immobilization in chitosan membrane was 8, while the pH of measurement was 7.3. The result showed that chitosan membrane thickness influenced the amount of immobilized urease and the performance of urea biosensor. The increasing of chitosan membrane thickness can increase immobilized urease, but decrease the performance of urea biosensor. The best performance of urea biosensor was gained at 0.21 mm urease-chitosan membrane thickness with Nernstian factor 28.47 mV/decade, while the range of urea solution concentration can be measured from 0.06 ppm up to 6 ppm and the detection limit were 0.073 ppm. The biosensor response time was 280 seconds, while the efficiency of urea biosensor up to 32 times of measurements, and the accuracy of biosensor was 96% until 98 %.

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala limpahan rahmat, karunia dan hidayah-Nya yang telah diberikan sehingga dapat menyelesaikan penulisan tugas akhir dengan judul **Pengaruh Ketebalan Membran Kitosan Terhadap Kinerja Biosensor Potensiometri Urea**. Penulisan tugas akhir ini merupakan salah satu syarat kelulusan dan memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang kimia di Fakultas MIPA Universitas Brawijaya.

Penulis juga mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada semua pihak yang telah membantu baik secara langsung maupun tidak langsung selama pelaksanaan penelitian. Ungkapan terima kasih tersebut penulis sampaikan kepada:

1. Dr. Ani Mulyasuryani, MS., selaku Dosen Pembimbing I, atas segala pengarahan, perhatian, tenaga, pikiran dan kesabaran yang telah diberikan selama penyusunan tugas akhir ini.
2. Dra. Anna Roosdiana, M.App.Sc., selaku Dosen Pembimbing II, atas bimbingan dan kesabaran yang diberikan selama penyusunan tugas akhir ini.
3. Dr. Diah Mardiana, selaku Dosen Penasehat Akademik, atas nasehat dan perhatiannya selama melaksanakan studi.
4. Arie Srihardyastutie, S.Si., M.Kes, Drs. Budi Kamulyan, MSc., Dr. Soebiantoro, Apt., MSc. dan Dra. Sri Wardhani, M.Si., selaku Dosen Penguji, atas segala masukan dan saran yang diberikan untuk perbaikan naskah tugas akhir.
5. Kedua orang tua yang selalu mengiringi penulis dengan doa, perhatian dan kasih sayang serta dukungan hingga terselesaikannya tugas akhir ini.

Penulis juga menyadari tugas akhir ini masih jauh dari sempurna, maka dari itu dengan kerendahan hati, penulis mengharap kritik dan saran yang bersifat membangun guna perbaikan dan penyempurnaannya sehingga dapat bermanfaat bagi kita semua.

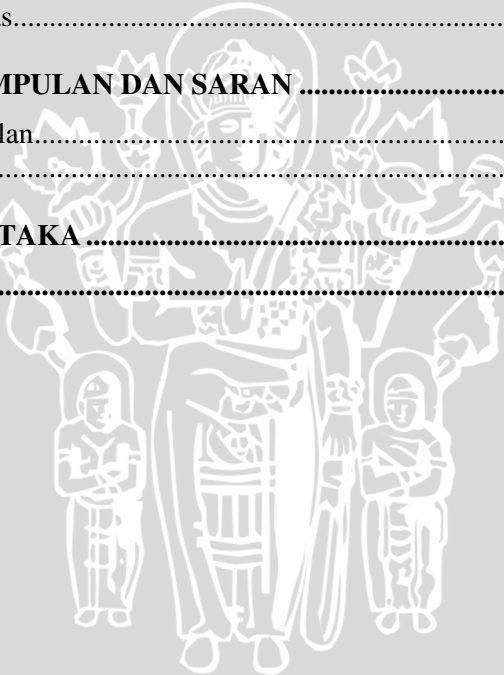
Malang, 15 Januari 2009

Penulis

DAFTAR ISI

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	xiii
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan Penelitian	3
1.5 Manfaat Penelitian	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Biosensor	4
2.1.1 Bioaktif	4
2.1.2 Transduser	10
2.1.3 Kinerja Biosensor	11
2.2 Biosensor Potensiometri Urea	12
BAB III. METODE PENELITIAN	17
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	17
3.2 Bahan dan Alat Penelitian	17
3.2.1 Bahan Penelitian	17
3.2.2 Alat Penelitian	17
3.3 Metode Penelitian	18
3.4 Cara Kerja Penelitian	18
3.4.1 Preparasi Enzim dan Larutan	18

3.4.2	Pembuatan Biosensor Potensiometri Urea.....	19
3.4.3	Penentuan Pengaruh Ketebalan Membran Kitosan Terhadap Kinerja Biosensor Potensiometri Urea.....	21
3.4.4	Penentuan Karakter Biosensor Potensiometri Urea.....	22
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....		24
4.1	Pembuatan Biosensor Potensiometri Urea.....	24
4.2	Pengaruh Ketebalan Membran Kitosan Terhadap Kinerja Biosensor Potensiometri Urea.....	25
4.3	Karakter Biosensor Potensiometri Urea.....	28
4.3.1	Waktu Respon Biosensor Potensiometri Urea.....	28
4.3.2	Efisiensi Biosensor Potensiometri Urea.....	29
4.3.3	Validitas.....	30
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN.....		32
5.1	Kesimpulan.....	32
5.2.	Saran.....	32
DAFTAR PUSTAKA.....		33
LAMPIRAN.....		36



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1	Struktur Kitosan7
Gambar 2.2	Membran Kitosan7
Gambar 2.3	Kurva Hubungan Jumlah Enzim, Jumlah substrat dan Kecepatan reaksi Enzimatis9
Gambar 2.4	Biosensor Potensiometri Urea14
Gambar 3.1	Biosensor Urea Hasil Perancangan.....20
Gambar 4.1	Kurva Hubungan ΔE_{sel} dengan Log [Urea] pada Berbagai Ketebalan Membran.....26
Gambar 4.2	Kurva Hubungan E_{sel} Larutan Urea 0,06 hingga 6 ppm dan Waktu Pengukuran29
Gambar L.5.1	Kurva Hubungan antara Log [urea] dengan ΔE_{sel} pada Ketebalan Membran Kitosan 0,21 mm.....71
Gambar L.5.2	Kurva Penentuan Kisaran Konsentrasi Biosensor Potensiometri Urea pada Ketebalan Membran Kitosan 0,21 mm71
Gambar L.5.3	Kurva Penentuan Batas Deteksi Biosensor Urea dengan Ketebalan Membran Kitosan 0,21 mm.....72
Gambar L.5.4	Kurva Penentuan Bilangan Nersnt pada Biosensor Potensiometri Urea dengan Ketebalan Membran Kitosan 0,21 mm.....72
Gambar L.6	Kurva Penentuan Bilangan Nernst Biosensor Potensiometri Urea pada Pengukuran II.....75
Gambar L.8	Kurva Baku Hubungan ΔE_{sel} dan Log Urea untuk Penentuan Kadar Urea Sampel Urin.....78

DAFTAR TABEL

		Halaman
Tabel 4.1	Potensial Sel Larutan Urea 10^{-8} - 10^{-1} M yang Terukur Oleh Elektroda Gelas dan Biosensor Potensiometri Urea dengan Ketebalan Membran Kitosan 0,21 mm.....	25
Tabel 4.2	Bilangan Nernst, Kesalahan Pengukuran, Jumlah dan Konsentrasi Urease Teramobilkan pada Berbagai Ketebalan Membran.....	27
Tabel 4.3	Kisaran Konsentrasi dan Batas Deteksi Biosensor Potensiometri Urea pada Berbagai Ketebalan Membran Kitosan	28
Tabel 4.4	Perubahan bilangan Nernst dan Kesalahan Pengukuran pada Pengulangan Pemakaian Biosensor yang Diaplikasikan pada 8 Variasi Konsentrasi Urea.....	30
Tabel 4.5	Perbandingan Kadar Urea dalam Urin Hasil Pengukuran Laboratorium Klinik Melati Terhadap Kadar Urea yang Terukur dengan Biosensor Urea dan Kesalahan Pengukuran	31
Tabel L.1	Tabel Hubungan Antara Volume Urea Konsentrasi Tinggi yang Dipipet dan Volume Pengenceran hingga Didapatkan Konsentrasi Urea yang Lebih Rendah.....	42
Tabel L.2.3	Absorbansi Larutan Urease Sisa Amobilisasi, Diukur pada λ maks = 539,7 nm.....	46
Tabel L.4.1	Data E_{sel} Berbagai Konsentrasi Urea (10^{-8} - 10^{-1} M), Hasil Pengukuran Elektroda Gelas dan Biosensor Urea pada pH=7,3, T=27°C, t=6menit, Ketebalan Membran Kitosan 0,21 mm.....	56
Tabel L.4.2	Data ΔE_{sel} Berbagai Konsentrasi Urea (10^{-8} - 10^{-1} M), pada Ketebalan Membran Kitosan 0,21 mm (Sebelum Uji Q).....	57

Tabel L.4.3	Tabel Q Hitung Data ΔE_{sel} Berbagai Konsentrasi Urea (10^{-8} - 10^{-1} M), pada Ketebalan Membran Kitosan 0,21 mm.....	58
Tabel L.4.4	Data ΔE_{sel} Berbagai Konsentrasi Urea (10^{-8} - 10^{-1} M), Ketebalan Membran= 0,21 mm (Data yang Lolos Uji Q).....	59
Tabel L.4.5	Data E_{sel} Berbagai Konsentrasi Urea (10^{-8} - 10^{-1} M), Hasil Pengukuran Biosensor Urea pada pH=7,3,T=27°C, t=6 menit, Ketebalan Membran Kitosan 0,31 mm.....	59
Tabel L.4.6	Data ΔE_{sel} Berbagai Konsentrasi Urea (10^{-8} - 10^{-1} M), Ketebalan Membran=0,31 mm (Sebelum Uji Q).....	61
Tabel L.4.7	Tabel Q Hitung Data ΔE_{sel} Berbagai Konsentrasi Urea (10^{-8} - 10^{-1} M), pada Ketebalan Membran Kitosan 0,31 mm.....	61
Tabel L.4.8	Data ΔE_{sel} Berbagai Konsentrasi Urea (10^{-8} - 10^{-1} M), Ketebalan Membran= 0,31 mm (Data yang Lolos Uji Q).....	62
Tabel L.4.9	Data E_{sel} Berbagai Konsentrasi Urea (10^{-8} - 10^{-1} M), Hasil Pengukuran Biosensor Urea pada pH=7,3,T=27°C, t=6menit, Ketebalan Membran Kitosan 0,36 mm.....	62
Tabel L.4.10	Data ΔE_{sel} Berbagai Konsentrasi Urea (10^{-8} - 10^{-1} M), Ketebalan Membran= 0,36 mm (Sebelum Uji Q).....	64
Tabel L.4.11	Tabel Q hitung Data ΔE_{sel} Berbagai Konsentrasi Urea (10^{-8} - 10^{-1} M), Pada Ketebalan Membran Kitosan 0,36 mm.....	64
Tabel L.4.12	Data ΔE_{sel} Berbagai Konsentrasi Urea (10^{-8} - 10^{-1} M), Ketebalan Membran= 0,36 mm (Data yang Lolos Uji Q).....	65
Tabel L.4.13	Data E_{sel} Berbagai Konsentrasi Urea (10^{-8} - 10^{-1} M), Hasil Pengukuran Biosensor Urea pada pH=7,3,T=27°C, t=6menit, Ketebalan Membran Kitosan 0,43 mm.....	66

Tabel L.4.14	Data ΔE_{sel} Berbagai Konsentrasi Urea (10^{-8} - 10^{-1} M), Ketebalan Membran= 0,43 mm (Sebelum Uji Q).....	67
Tabel L.4.15	Tabel Q Hitung Data ΔE_{sel} Berbagai Konsentrasi Urea (10^{-8} - 10^{-1} M), pada Ketebalan Membran Kitosan 0,43 mm.....	67
Tabel L.4.16	Data ΔE_{sel} Berbagai Konsentrasi Urea (10^{-8} - 10^{-1} M), Ketebalan Membran= 0,43 mm (Data yang Lolos Uji Q).....	68
Tabel L.4.17	Data E_{sel} Berbagai Konsentrasi Urea (10^{-8} - 10^{-1} M), Hasil Pengukuran Biosensor Urea pada pH=7,3, T=27°C t=6menit, Ketebalan Membran Kitosan 0,46 mm.....	68
Tabel L.4.18	Data ΔE_{sel} Berbagai Konsentrasi Urea (10^{-8} - 10^{-1} M), Ketebalan Membran= 0,46 mm (Sebelum Uji Q).....	69
Tabel L.4.19	Tabel Q Hitung Data ΔE_{sel} Berbagai Konsentrasi Urea (10^{-8} - 10^{-1} M), pada Ketebalan Membran Kitosan 0,46 mm.....	70
Tabel L.4.20	Data ΔE_{sel} Berbagai Konsentrasi Urea (10^{-8} - 10^{-1} M), Ketebalan Membran= 0,46 mm (Data yang lolos uji Q).....	70
Tabel L.6	Data E_{sel} dengan Ketebalan Membran 0,21 mm , Konsentrasi Urea yang diukur 0-10 ppm pada pH=7,3, T=27°C; t=6menit.....	73
Tabel L.7	Hubungan E_{sel} Terhadap Waktu pada Ketebalan Membran Kitosan 0,21 mm, pH=7,3; T=27°C.....	76
Tabel L.8	Data E_{sel} Sampel Urin.....	78

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Lampiran 1	Preparasi Enzim dan Larutan.....	36
Lampiran 2	Penentuan Ketebalan Membran dan Kadar Protein..	45
Lampiran 3	Diagram Kerja	48
Lampiran 4	Data Potensial Sel.....	56
Lampiran 5	Penentuan Parameter Kinerja Biosensor	71
Lampiran 6	Penentuan Efisiensi Biosensor.....	73
Lampiran 7	Penentuan Waktu Respon.....	76
Lampiran 8	Validasi Biosensor Potensiometri Urea.....	78



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Urea ($(\text{NH}_2)_2\text{CO}$) adalah senyawa organik yang secara alami dapat dihasilkan oleh tubuh melalui metabolisme protein dan diekskresikan dari tubuh bersama urin (Martoharsono, 1984). Kadar urea normal dalam urin orang dewasa berkisar antara 12 hingga 20 gram/24 jam (Sacher, 2005). Apabila kadar urea dalam urin melebihi kadar normal, maka mengindikasikan disfungsi ginjal. Kadar urea kurang dari kadar normal mengindikasikan kurangnya asupan protein, sehingga dapat menghambat pertumbuhan pada anak-anak. Berdasarkan uraian tersebut, maka diperlukan suatu alat yang diperlukan untuk mengetahui kadar urea dalam urin. Biosensor potensiometri urea adalah salah satu alat yang dapat dikembangkan untuk mendeteksi kadar urea dalam urin secara selektif (Bennington, 1984).

Beberapa biosensor potensiometri urea telah dikembangkan, diantaranya oleh Eggenstein, dkk (1999) yang menggunakan *Double Matrix Membrane* (DMM) sebagai media amobilisasi urease dan transduser sensor NH_4^+ . Biosensor tersebut memiliki bilangan Nernst 52 mV/dekade dengan kesalahan lebih dari 12%. Biosensor potensiometri urea lainnya dikembangkan oleh Julianto dan Yahya (2007), dengan menggunakan gelatin sebagai media amobilisasi urease dan transduser sensor H^+ . Biosensor tersebut kurang sensitif dengan batas deteksi lebih besar dari 10^{-4}M . Pada pH 7,3 pengukuran dilakukan pada temperatur ruang, sedangkan pada pH 8 pengukuran dilakukan pada temperatur 60°C sehingga sulit untuk diaplikasikan. Untuk memperbaiki kinerja biosensor potensiometri urea dengan transduser sensor H^+ , pada penelitian ini digunakan membran kitosan sebagai media amobilisasi urease.

Kitosan merupakan suatu biopolimer yang mampu berikatan silang dengan glutaraldehid sehingga dapat dibentuk menjadi membran berpori. Enzim dapat teramobilisasi pada permukaan membran kitosan secara adsorpsi fisik dan masuk ke dalam pori (Xiaoli, 2007). Kitosan cenderung tidak bereaksi dengan sampel

darah maupun urin, sehingga diprediksikan tidak akan mengganggu analisis dengan biosensor (Gu, 2001). Urease yang digunakan dalam pembuatan biosensor potensiometri urea merupakan hasil isolasi *Schizosaccharomyces pombe* yang dalam keadaan bebas memiliki $V_m = 0,4046 \mu\text{mol}/\text{menit}$ dan $K_M = 0,2065 \text{ mM}$ pada pH 8 (Hidayati, 2006). Dalam keadaan teramobilisasi urease memiliki $V_m = 0,02 \mu\text{mol}/\text{menit}$ dan $K_M = 15,94 \text{ mM}$ (Ayhan, 2002).

Kinerja biosensor potensiometri urea yang meliputi bilangan Nernst, kisaran konsentrasi, batas deteksi, waktu respon dan efisiensi tergantung pada pH larutan yang dianalisis, metode amobilisasi urease dan jumlah urease yang teramobilkan (Eggin, 2002). Pada dasarnya ketiga faktor itu berpengaruh terhadap aktivitas urease. Urea dengan adanya urease dalam air, akan terhidrolisis menghasilkan CO_2 dan NH_3 . Urease memiliki aktivitas maksimum pada pH 7,3 (Imron, 2008). Pada pH 7,3 CO_2 dalam air terlarut sebagai ion HCO_3^- dan H_3O^+ , sedangkan NH_3 dalam air terlarut sebagai ion NH_4^+ dan OH^- . Molekul yang sampai ke transduser ada 2 kemungkinan yakni CO_2 atau NH_3 . Perubahan $[\text{H}_3\text{O}^+]$ atau $[\text{OH}^-]$ akan sebanding dengan konsentrasi larutan urea yang terhidrolisis.

Jumlah urease amobil dipengaruhi oleh ketebalan membran kitosan. Jumlah urease yang teramobilkan akan meningkat sebanding dengan ketebalan membran, tetapi jika ketebalan terlalu tinggi, difusi hasil reaksi menuju transduser menjadi terhambat. Hal ini dapat menimbulkan penurunan kinerja biosensor. Dengan demikian, pada penelitian ini dipelajari pengaruh ketebalan membran kitosan terhadap kinerja biosensor potensiometri urea.

1.1. Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah :

1. Apakah biosensor potensiometri urea dapat dibuat dengan menggunakan membran kitosan sebagai media amobilisasi urease?
2. Bagaimana pengaruh ketebalan membran kitosan terhadap kinerja biosensor potensiometri urea?
3. Bagaimana karakter biosensor potensiometri urea hasil perancangan?

1.3. Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Urease yang digunakan pada pembuatan biosensor potensiometri urea adalah hasil isolasi dari *Schizosaccharomyces pombe* 3054.
2. Ketebalan membran kitosan yang dipelajari adalah 0,21 mm, 0,31 mm, 0,36 mm, 0,43 mm dan 0,46 mm.
3. Lama amobilisasi urease adalah 24 jam.
4. Parameter kinerja biosensor adalah kisaran konsentrasi pengukuran, batas deteksi, kepekaan, waktu respon dan efisiensi biosensor.
5. Pengukuran potensial larutan urea dilakukan pada pH 7,3 dan temperatur 27 °C.
6. Validasi biosensor potensiometri urea dilakukan dengan mengukur sampel urin dari Laboratorium Klinik Melati.

1.4. Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah:

1. Membuat biosensor potensiometri urea menggunakan membran kitosan sebagai media amobilisasi urease.
2. Mempelajari pengaruh ketebalan membran kitosan terhadap kinerja biosensor potensiometri urea.
3. Mengetahui karakter biosensor potensiometri urea dengan membran kitosan hasil perancangan.

1.5. Manfaat

Menghasilkan biosensor potensiometri urea yang dapat digunakan untuk menentukan kadar urea dan dapat diaplikasikan untuk mengukur kadar urea dalam urin.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Biosensor

Biosensor adalah kombinasi antara teknik elektrokimia dengan substansi biologis. Biosensor memanfaatkan reaksi spesifik yang terjadi antara substansi biologis dengan analit, sehingga dihasilkan produk dengan sinyal elektrik yang dapat dideteksi oleh sensor. Sinyal elektrik yang terdeteksi menunjukkan jumlah dari analit yang bereaksi (Wang, 2000).

Biosensor terdiri atas 3 bagian utama yaitu bioaktif, transduser dan elemen detektor (Wicaksono, 2000). Biosensor memanfaatkan molekul-molekul yang terdapat pada makhluk hidup (biomolekul) untuk dapat merespon analit. Menurut Pijanowska dan Torbicz (2000), molekul biologi yang dapat digunakan sebagai bioaktif dapat digolongkan menjadi 4 golongan utama, yaitu sel bakteri, jaringan organisme tingkat tinggi, antibodi dan enzim. Bioaktif dapat bereaksi dengan analit secara selektif.

Williams (1993), mengatakan transduser adalah sebuah alat yang jika digerakkan oleh suatu energi di dalam sebuah sistem transmisi, maka akan menyalurkan energi tersebut dalam bentuk yang sama atau dalam bentuk yang berlainan ke sistem transmisi berikutnya. Transmisi energi ini bisa berupa listrik, mekanik, kimia, optik (radiasi) dan termal (panas). Elemen detektor adalah suatu komponen yang bertanggung jawab mendeteksi perubahan analit dalam suatu biosensor.

2.1.1 Bioaktif

Bioaktif adalah molekul biologi yang dapat bereaksi dengan analit secara spesifik. Enzim merupakan bioaktif yang paling luas penggunaannya. Keuntungan dari penggunaan enzim terletak pada selektifitas dan sensitifitasnya. Beberapa contoh enzim yang digunakan adalah urease dalam analisis urea, asparaginase dalam analisis asparagin, katalase dalam analisis peroksida, tripsin dalam analisis peptida, lipase dalam analisis lemak, β -glukosidase dalam analisis amigdalin dan invertase dalam analisis sukrosa (Pijanowska dan Torbizs, 2000).

Dalam keadaan bebas enzim mudah mengalami proses membuka, terutama oleh temperatur. Proses ini menimbulkan perubahan konformasi dan penurunan aktivitas enzim. Enzim yang membuka, lebih mudah mengalami perubahan kimia yang bersifat destruktif (Suhartono, 1989). Bioaktif dalam suatu biosensor yang berupa enzim harus diamobilkan pada suatu permukaan transduser. Amobilisasi enzim adalah suatu keadaan di mana enzim tidak bebas bergerak secara fisik dan kimia, sehingga dapat dikendalikan atau diatur kapan enzim harus kontak dengan substrat (Fennema, 1996).

Dasar teknologi amobilisasi adalah membuat konformasi aktif enzim tahan terhadap lingkungan. Caranya adalah 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 terjaga lebih baik dan karena enzim mudah dipisahkan dari larutan pereaksi (Suhartono, 1989). Dalam proses amobilisasi enzim, pengikatan enzim ke enzim lain atau ke suatu *carrier* harus dilaksanakan tanpa merusak struktur ruang tiga dimensi dari sisi aktif enzim sehingga spesifitas substrat tidak terganggu oleh proses amobilisasi (Smith, 1995). Metode-metode amobilisasi enzim adalah (Eggins, 2002):

1. Pengikatan enzim

- a. Adsorpsi fisik

Pada metode adsorpsi fisik, enzim hanya terikat pada permukaan media amobilisasi, ikatan yang terjadi sangat lemah dan mudah lepas.

- b. Ikatan kovalen

Pada metode ikatan kovalen, gugus fungsi enzim berikatan dengan gugus fungsi dari media amobilisasi. Pada umumnya, gugus fungsi enzim yang tidak berperan dalam katalisis berikatan dengan gugus fungsi dari media amobilisasi.

- c. Ikatan silang

Metode ini didasarkan pada pembentukan ikatan silang antara molekul-molekul enzim. Metode ikatan silang tidak menggunakan suatu matriks. Gugus fungsional dalam molekul enzim bisa digunakan untuk pembentukan ikatan antarmolekul seperti gugus amino dari lisin, gugus fenolik dari tirosin dan gugus imidazol dari histidin.

2. Metode penjebakan enzim

a. Mikrokapsul

Metode ini sering digunakan pada awal-awal perkembangan biosensor. Enzim diamobilkan pada suatu membran *semipermeable*, sehingga tidak mudah terkontaminasi dan terdegradasi. Selain itu enzim menjadi lebih stabil terhadap perubahan pH dan suhu. Namun, terkadang membran masih mungkin dilalui beberapa materi yang sangat kecil seperti gas dan elektron yang dapat mengganggu kinerja enzim.

b. Penjebakan dalam pori membran

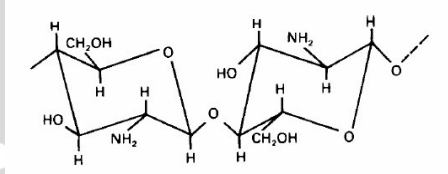
Pada metode ini, enzim dijebak di dalam pori membran. Umumnya, jumlah enzim yang teramobilkan dengan metode penjebakan sangat banyak dan rapat, namun hal ini justru menghalangi difusi dari larutan analit sehingga menghambat jalannya reaksi. Gel penjebak enzim yang banyak digunakan yaitu, kolagen, gelatin, agar, alginate, karagenan, dan kitosan.

Kitosan termasuk senyawa kelompok polisakarida, yaitu kitin yang telah mengalami deasetilasi (kehilangan gugus asetil). Kitosan merupakan senyawa tidak larut dalam air, larutan basa kuat dan beberapa pelarut organik seperti alkohol, aseton, dimetilformamida dan dimetilsulfoksida, dan sedikit larut dalam HCl dan HNO₃. Kitosan larut baik dalam asam format dan asam asetat. Kitosan tidak beracun dan mudah terbiodegradasi. Berat molekul kitosan adalah sekitar $1,2 \cdot 10^5$ g/mol, bergantung pada degradasi yang terjadi selama proses deasetilasi (Pasaribu, 2004).

Kitosan dapat dibentuk menjadi membran berpori sehingga enzim dapat teradsorpsi pada permukaan sekaligus terjebak dalam pori membran. Glutaraldehid yang ditambahkan sebagai *crosslinker* pada pembuatan membran kitosan dapat meningkatkan jumlah pori membran (Xiaoli, 2005). Kitosan tidak bereaksi dengan sampel darah maupun urin, sehingga diprediksikan tidak akan mengganggu analisis dengan biosensor (Gu, 2001).

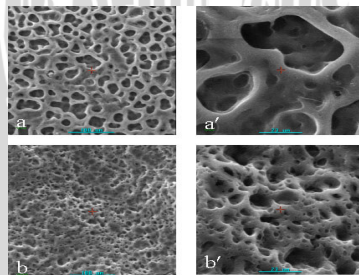
Membran kitosan sebagai media amobilisasi dibuat dengan melarutkan kitosan pada asam asetat 0,8 %, dituang pada suatu plat datar dan dipanaskan pada temperatur 50°C. Setelah kering akan dihasilkan suatu membran yang kemudian dinetralkan dengan larutan NaOH 1% selama 30 menit, dibilas dengan akuades dan direndam

dalam air sampai membran digunakan. Apabila akan digunakan untuk mengambobilisasi enzim, maka membran terlebih dahulu direndam dalam asam asetat pH 4, dibilas akuades kembali, dan direndam dalam larutan enzim. Struktur kimia dari kitosan ditunjukkan pada Gambar 2.1 (Magalhaes dan Machado, 2002).



Gambar 2.1 Struktur Kitosan

Membran kitosan ada 2 macam ditinjau dari sifatnya, yaitu berpori dan tak berpori. Pada umumnya, membran kitosan yang dibuat dengan *crosslinker* dan disertai pemanasan pada proses pengeringannya tergolong membran berpori. Luas permukaan membran kitosan berpori lebih besar daripada luas permukaan membran kitosan tak berpori. Jumlah enzim yang teramobilisasi di dalam membran kitosan berpori lebih banyak dan memiliki aktivitas yang lebih besar daripada enzim yang teramobilkan pada membran kitosan tak berpori. Urease yang teramobilkan pada membran kitosan berpori memiliki aktivitas 5 kali lebih besar dibanding urease yang teramobilkan pada membran kitosan tak berpori, dengan perbandingan nilai aktivitas $17,22 \text{ U/min cm}^2$: $3,6 \text{ U/min cm}^2$. Gambar 2.2 adalah gambar membran kitosan berpori dengan ketebalan $15,542 \mu\text{m}$ (a,a') dan $9,678 \mu\text{m}$ (b,b') yang merupakan hasil pengamatan dengan mikroskop elektron (Xiaoli, 2005).



Gambar 2.2 Membran Kitosan

Ketebalan membran kitosan yang digunakan untuk mengamobilkan enzim harus diatur agar enzim dapat teramobilkan dengan optimal. Ketebalan membran kitosan berpengaruh terhadap karakteristik biosensor. Biosensor dengan lapisan membran tebal mempunyai respon yang lebih stabil daripada biosensor dengan lapisan membran kitosan yang lebih tipis, tetapi membran yang terlalu tebal mengakibatkan waktu respon biosensor cukup lama (Baronas dkk, 2003). Secara teoritis, semakin tebal suatu membran maka substrat dan jumlah enzim yang terdapat pada membran juga semakin banyak, artinya konsentrasi substrat dan enzim tinggi sehingga kecepatan reaksi juga akan meningkat, namun hal ini berlaku hanya sampai konsentrasi substrat tertentu, karena setelah itu reaksi akan berjalan konstan, walaupun konsentrasi substrat ditambah. Persamaan reaksi enzimatik yang melibatkan substrat tunggal dapat digambarkan sebagai berikut (Wang, 2000)



Substrat bersama enzim bergabung membentuk kompleks intermediate sebelum terurai menjadi produk dan enzim. Kecepatan reaksi enzimatik yang terjadi dapat dirumuskan dari persamaan reaksi di atas, yaitu (Eggins, 2002)

$$[E]_T = [E] + [ES]$$

$$V = k_2 [ES]$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 [E] [S] - k_{-1} [ES] - k_2 [ES] = 0$$

$$k_1 \{ [E]_T - [ES] \} [S] = (k_{-1} + k_2) [ES]$$

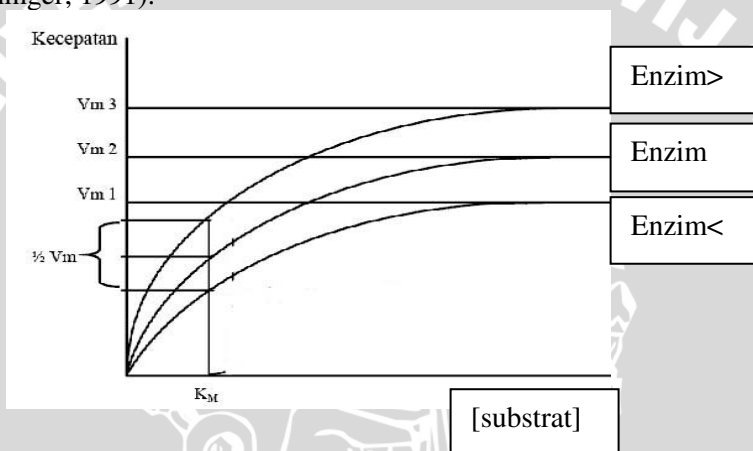
$$[ES] (k_{-1} + k_2 + k_1 [S]) = k_1 [E]_T [S]$$

$$[ES] = \frac{k_1 [E]_T [S]}{k_{-1} + k_2 + k_1 [S]} = \frac{[E]_T [S]}{K_M + [S]}, \quad K_M = (k_{-1} + k_2) / k_1 \text{ jadi}$$

$$V = k_2 [ES] = \frac{k_2 [E]_T [S]}{K_M + [S]} = \frac{V_m [S]}{K_M + [S]}$$

K_M adalah tetapan Michaelis Menten dan V_m adalah kecepatan maksimum dari reaksi enzimatik. Enzim memiliki kinerja yang baik

jika memiliki nilai K_M rendah dan V_m yang tinggi. Kinerja enzim dalam keadaan bebas secara umum lebih baik dibanding kinerja enzim dalam keadaan teramobilisasi, enzim yang teramobilkan memiliki nilai K_M lebih tinggi daripada enzim yang bebas dan V_m yang lebih rendah daripada V_m enzim dalam keadaan bebas. Penurunan V_m antara keadaan bebas dan teramobilisasi ini diakibatkan oleh halangan ruang selama amobilisasi (Ayhan, 2002). Kecepatan reaksi enzimatik dipengaruhi oleh jumlah substrat dan jumlah enzim. Hubungan antara jumlah substrat, jumlah enzim dan kecepatan reaksi enzimatik dapat dilihat pada Gambar 2.3 (Lehninger, 1991).



Gambar 2.3 Kurva Hubungan Jumlah Enzim, Jumlah Substrat dan Kecepatan Reaksi Enzimatik

Pada Gambar 2.3 dapat dilihat bahwa pada konsentrasi enzim tetap, jika konsentrasi substrat berubah maka kecepatan reaksi juga berubah. Pada konsentrasi substrat yang rendah, kecepatan reaksi rendah. Dengan meningkatnya konsentrasi substrat maka kecepatan reaksi juga meningkat secara linier hingga mencapai titik $\frac{1}{2} V_m$. Selanjutnya peningkatan kecepatan tidak berjalan secara linier hingga dicapai V_m . Saat sudah mencapai V_m penambahan konsentrasi substrat tidak lagi meningkatkan kecepatan reaksi karena kecepatan sudah berjalan konstan. Nilai tetapan Michaelis merupakan nilai konsentrasi substrat saat kecepatan bernilai $\frac{1}{2} V_m$ (Lehninger, 1991).

Pada biosensor potensiometri urea dengan membran kitosan, konsentrasi substrat yaitu urea dapat diubah-ubah dengan pengaturan

ketebalan membran kitosan. Jika ketebalan membran kecil, maka konsentrasi urea yang melalui membran rendah, sehingga kecepatan reaksi hidrolisis yang dicapai juga rendah. Peningkatan ketebalan membran kitosan, menyebabkan konsentrasi urea yang melalui membran meningkat, hal ini mendorong terjadinya peningkatan kecepatan reaksi hidrolisis. Namun peningkatan kecepatan reaksi hidrolisis berhenti sampai konsentrasi tertentu dari urea.

Kecepatan reaksi hidrolisis juga dipengaruhi oleh konsentrasi enzim. Jika jumlah enzim yang berperan dalam reaksi sedikit, maka kecepatan reaksi yang terjadi rendah dan sebaliknya (Lehninger, 1991). Pada biosensor potensiometri urea dengan membran kitosan, jumlah enzim yang berperan dalam reaksi hidrolisis urea diatur melalui ketebalan membran kitosan yang digunakan untuk mengamobilisasi urease.

2.1.2. Transduser

Biosensor memiliki komponen transduser, yaitu permukaan deteksi yang berfungsi untuk mengolah suatu perubahan elektrokimia menjadi sinyal listrik yang terukur. Transduser terletak antara elemen biologis dan elemen detektor. Ada beberapa jenis transduser yang sering digunakan dalam biosensor, antara lain biosensor optik, termal, resonan, ion sensitif FETs (ISFETs) dan elektrokimia. Pada biosensor elektrokimia, sinyal yang terukur berupa sinyal listrik. Prinsip dasar dari biosensor elektrokimia adalah, reaksi kimia menghasilkan suatu ion atau elektron yang akan mengubah sifat elektrik dari larutan. Perubahan tersebut dapat digunakan sebagai parameter pengukuran. Biosensor elektrokimia dapat diklasifikasikan menjadi konduktometri, amperometri dan potensiometri (Chauvan dan Singh, 2004; Mohanty, 2001).

Biosensor potensiometri mengukur suatu perubahan potensial oksidasi atau reduksi dari reaksi elektrokimia. Prinsip biosensor potensiometri adalah, saat elektroda yang terhubung dengan bioreseptor kontak dengan analit, akan terjadi perubahan potensial. Perubahan potensial ini terjadi karena adanya reaksi enzimatik menghasilkan suatu produk yang menyebabkan perubahan aktivitas ion analit. Parameter yang terukur adalah potensial sel larutan dan persamaan yang digunakan adalah persamaan Nernst (Chauvan dan Singh, 2004; Mohanty, 2001).

Elektroda selektif ion digunakan sebagai transduser pada biosensor potensiometri. Tiga jenis elektroda selektif ion yang digunakan adalah (Chaplin, 2004) :

1. Elektroda gelas untuk kation (misalnya elektroda pH normal), dimana pendeteksi analit adalah membran gelas terhidrasi sangat tipis.
2. Elektroda gelas pH terlapiskan dengan membran gas yang selektif untuk CO_2 , NH_3 , atau H_2S . Difusi gas melewati membran ini menyebabkan perubahan pH dari larutan di antara membran dan elektroda.
3. Elektroda zat padat, dimana membran gelas diganti dengan membran tipis khusus sebagai konduktor ion yang terbuat dari campuran perak sulfida dan perak halida.

Elektroda gelas merupakan salah satu transduser sensor pH yang dapat digunakan sebagai alat sensor potensiometri. 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 alkali lain seperti Li^+ , Na^+ dan K^+ . Urutan selektifitas membran gelas adalah $\text{H}^+ > \text{Ag}^+ > \text{K}^+ = \text{NH}_4^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$. Pada elektroda gelas, katoda merupakan elektroda indikator dan anoda merupakan elektroda pembanding luar (Harris, 2000).

2.1.3. Kinerja Biosensor

Kinerja biosensor ditentukan melalui beberapa parameter antara lain kisaran konsentrasi, batas deteksi, kepekaan, waktu respon dan efisiensi biosensor. Kisaran konsentrasi menunjukkan rentang konsentrasi analit yang masih dapat dideteksi oleh biosensor urea secara kuantitatif. Kisaran konsentrasi pengukuran dapat diketahui dari grafik hubungan antara \log [analit] terhadap ΔE_{sel} yang menunjukkan hubungan linier. Dari kisaran konsentrasi pengukuran biosensor dapat juga diketahui batas deteksi biosensor. Batas deteksi menunjukkan batas konsentrasi terendah yang dapat direspon oleh biosensor.

Kepekaan biosensor potensiometri ditunjukkan oleh kemiringan dari grafik hubungan antara ΔE_{sel} dengan \log [analit]. Besarnya kemiringan garis dari kurva tersebut adalah bilangan Nernst. Biosensor yang kepekaannya tinggi, memiliki bilangan

Nernst mendekati bilangan Nernst teoritis. Bilangan Nernst teoritis dari biosensor potensiometri urea dengan transduser sensor H^+ adalah 29,6 mV/dekade.

Kinerja biosensor juga dapat diketahui dari parameter waktu. Parameter waktu tersebut antara lain waktu respon dan *working lifetime*. Waktu respon didefinisikan sebagai waktu yang diperlukan oleh substrat untuk bereaksi dengan bantuan enzim sehingga dihasilkan suatu produk yang dapat dideteksi oleh sensor. *Working lifetime* menunjukkan masa penggunaan biosensor sebagai sensor. Parameter ini berkaitan dengan stabilitas bioreseptor dan banyaknya pengukuran yang dilakukan. *Working lifetime* dapat dikaji sebagai efisiensi biosensor dengan cara melihat stabilitas biosensor tersebut pada pengukuran berulang kali (Eggins, 2002).

Faktor-faktor yang mempengaruhi kinerja biosensor adalah jumlah enzim yang terlibat, metode amobilisasi enzim, dan pH *buffer*. Pada dasarnya, ketiga faktor di atas berpengaruh secara langsung terhadap aktivitas enzim. Kecepatan reaksi sebanding dengan konsentrasi enzim, tapi bagaimana enzim diisolasi dan sejauh mana tingkat kemurnian enzim juga menjadi dasar pertimbangan. Aktivitas enzim sebanding dengan tingkat kemurniannya. Enzim dengan tingkat kemurnian yang tinggi memiliki aktivitas yang tinggi dan sebaliknya (Evans, 1991).

Metode amobilisasi berpengaruh terhadap aktivitas enzim. Enzim yang teramobilkan dengan adsorpsi fisik memiliki ikatan yang lemah dengan media amobilisasi, akibatnya enzim menjadi mudah lepas dan mengalami penurunan aktivitas. Enzim yang teramobilkan dengan penjabakan memiliki aktivitas yang relatif rendah meskipun jumlah enzim yang terlibat banyak, hal ini disebabkan karena kerapatan enzim yang sangat tinggi. Enzim yang teramobilkan dengan ikatan silang, aktivitasnya cukup tinggi. Kondisi pH *buffer* juga berpengaruh terhadap kinerja enzim dan biosensor (Eggins, 2002). Pada umumnya, kinerja enzim akan baik bila pH *buffer* yang digunakan sesuai dengan pH optimum kerja enzim. Urease bekerja optimum pada pH 7,3 hingga 7,4 (Imron, 2008).

2.2. Biosensor Potensiometri Urea

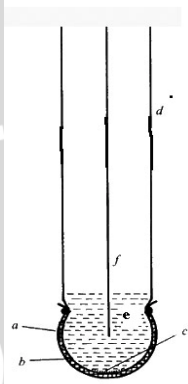
Biosensor potensiometri urea merupakan suatu jenis biosensor yang dapat mendeteksi kadar urea melalui suatu reaksi enzimatik. Pada biosensor potensiometri urea, digunakan urease yang dapat

menghidrolisis urea menghasilkan NH_3 dan CO_2 . Biosensor potensiometri urea telah dikembangkan diantaranya oleh Eggenstein dkk, Julianto dan Yahya. Pada biosensor potensiometri urea yang dikembangkan Eggenstein, urease diamobilisasi di antara dua membran (*Double matrix membrane*) yang dibentuk dari polikarbamilisulfonat dan transduser yang digunakan berupa transduser sensor NH_4^+ . Elektroda yang digunakan salah satu sisinya berupa perak yang dilapisi kertas saring. Biosensor ini memiliki kisaran konsentrasi $7,2 \times 10^{-5} \text{ M}$ - $2,1 \times 10^{-2} \text{ M}$, batas deteksi $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ dan bilangan Nernst 52 mV/dekade (Eggenstein, 1999).

Julianto mengembangkan biosensor potensiometri urea melalui optimasi massa urease amobil terhadap karakter biosensor pada kisaran massa 0,25g hingga 2g. Urease yang didapat dari *Schizosaccharomyces pombe* diamobilisasi dalam gelatin, dipotong kecil, dan dimasukkan dalam tabung. Tabung yang berisi urease teramobilisasi direkatkan ke elektroda gelas. Transduser yang digunakan adalah transduser sensor H^+ . Karakter biosensor dapat diketahui dengan mengukur besarnya potensial sel larutan urea pada kisaran konsentrasi 10^{-6} M hingga 1 M pada temperatur ruang. Dari hasil penelitian, diperoleh kinerja biosensor urea terbaik pada pH 7,3 dengan urease amobil sebanyak 1 gram. Kekurangan biosensor ini adalah selektifitas membran rendah, metode pelapisan urease tidak praktis dan kinerja biosensor yang dihasilkan masih kurang optimum diindikasikan dari bilangan Nernst sebesar 27,5 mV/dekade. Biosensor ini memiliki kisaran konsentrasi 10^{-3} M - 10^{-1} M , batas deteksi $3,802 \times 10^{-4} \text{ M}$ dan waktu respon 30 detik (Julianto, 2007).

Pada biosensor potensiometri urea yang dikembangkan oleh Yahya, metode deteksi, amobilisasi urease serta pelapisan urease ke elektroda gelas sama dengan biosensor yang dikembangkan Julianto. Perbedaannya hanya terletak pada kondisi pengukuran, pada penelitian Julianto pengukuran dilakukan pada temperatur ruang dan pH 7,3 sedangkan pada penelitian Yahya dilakukan pada pH 8 dan temperatur 60°C sehingga sulit untuk diaplikasikan. Biosensor ini memiliki kisaran konsentrasi 10^{-3} M - $1,0 \text{ M}$, batas deteksi $1,03 \times 10^{-3} \text{ M}$, waktu respon 35 detik dan bilangan Nernst 27,7 mV/dekade (Yahya, 2007). Secara umum kinerja biosensor potensiometri urea yang sudah dikembangkan di atas kurang optimal, hal ini terindikasi dari harga bilangan Nernst yang masih di bawah harga teoritis, yakni 59,2

mV/dekade untuk biosensor potensiometri urea dengan transduser sensor NH_4^+ dan 29,6 mV/dekade untuk biosensor potensiometri urea dengan transduser sensor H^+ . Biosensor potensiometri urea yang telah dikembangkan ditunjukkan pada Gambar 2.4 (Chaplin, 2004).



Gambar 2.4 Biosensor Potensiometri Urea

- Media amobilisasi urease
- Bioresseptor (biomolekul amobil): berupa urease amobil yang secara spesifik mengubah urea menjadi CO_2 dan NH_3
- Membran semipermeabel: berupa membran gelas
- Elektroda gelas: elektroda yang terhubung dengan membran gelas dan berisi elektroda pembanding internal
- Larutan asam: larutan dengan nilai aktivitas ion H^+ besar dan tetap
- Elektroda pembanding internal: elektroda pembanding yang dapat mengukur perubahan potensial membran, karena adanya perubahan konsentrasi H^+ di permukaan membran gelas

Pada elektroda gelas, katoda merupakan elektroda indikator dan anoda merupakan elektroda pembanding luar. Potensial sel pada elektroda gelas dapat dituliskan sebagai persamaan (2.1).

$$E_{\text{sel}} = K + 0,0592 \log [\text{H}^+] \quad (2.1)$$

Pada biosensor potensiometri urea, elektroda gelas dilapisi dengan membran kitosan yang mengandung urease teramobilisasi. Urease

yang digunakan dalam pembuatan biosensor potensiometri urea merupakan hasil isolasi *Schizosaccharomyces pombe* yang dalam keadaan bebas memiliki $V_m = 0,4046 \mu\text{mol}/\text{menit}$ dan $K_M = 0,2065 \text{ mM}$ pada pH 8 (Hidayati, 2006). Dalam keadaan teramobilisasi urease memiliki $V_m = 0,02 \mu\text{mol}/\text{menit}$ dan $K_M = 15,94 \text{ mM}$ (Ayhan, 2002).

Aktivitas urease dalam keadaan teramobilkan lebih rendah daripada aktivitas urease dalam keadaan bebas. Hal ini diakibatkan halangan ruang selama amobilisasi (Ayhan, 2002). Aktivitas urease yang dimurnikan dengan metode amonium sulfat dengan kejenuhan 30-45% adalah $0,733 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1}$ (Agustina, 2006).

Menurut Pijanowska, dkk (2000); Yun, dkk (2005); Renault, dkk (1999); Pijanowska dan Torbicz (2005); Evans (1991) reaksi hidrolisis urea dituliskan pada persamaan (2.2).



Mekanisme kerja biosensor potensiometri urea adalah, pada saat elektroda gelas yang dilapisi dengan urease amobil dicelupkan dalam larutan urea, urease amobil akan mempercepat reaksi hidrolisis urea menjadi NH_3 dan CO_2 . Pada pH 7,3, NH_3 dalam air terion sebagai NH_4^+ dan OH^- , sedangkan CO_2 terion sebagai HCO_3^- dan H_3O^+ . Mekanisme reaksi kesetimbangan NH_4^+ dan HCO_3^- ditunjukkan oleh persamaan (2.3) dan (2.4).



Molekul yang sampai ke transduser ada 2 kemungkinan, yaitu NH_3 dan CO_2 . Perubahan $[\text{OH}^-]$ atau $[\text{H}_3\text{O}^+]$ yang dihasilkan memiliki aktivitas yang sebanding dengan konsentrasi urea dalam analit. Potensial sel yang ditimbulkan oleh urea dinamakan E_{urea} . Persamaan E_{urea} jika yang terukur adalah molekul NH_3 dapat ditulis sesuai persamaan (2.5), akan tetapi jika yang terukur molekul CO_2 , maka persamaannya dapat ditulis sesuai persamaan (2.6).

$$E_{\text{urea}} = K' - 0,0296 \log [\text{urea}] \quad (2.5)$$

$$E_{\text{urea}} = K' + 0,0296 \log [\text{urea}] \quad (2.6)$$

Hubungan antara ΔE sel dengan konsentrasi urea dapat dituliskan pada persamaan (2.7).

$$\Delta E_{\text{sel}} = K'' - 0,0296 \text{ p Urea} \quad (2.7)$$

Selisih potensial (ΔE_{sel}) diperoleh dari E_{sel} hasil pengukuran dengan biosensor urea dan E_{sel} hasil pengukuran dengan elektroda gelas tanpa dilapisi kitosan-urease amobil. Ketebalan membran kitosan berpengaruh kinerja biosensor urea. Pada ketebalan tertentu banyaknya urea yang melalui membran dan jumlah urease yang teramobilisasi juga tertentu. Jika urea yang melalui membran dan jumlah enzim yang teramobilkan mencapai kondisi optimum kinerja urease, maka V_m akan tercapai. Selanjutnya dengan penambahan urea harga V akan konstan. Jika ketebalan membran kitosan terlalu tinggi maka kinerja biosensor akan menurun, waktu respon akan semakin lama karena waktu yang dibutuhkan oleh hasil hidrolisis untuk sampai ke transduser makin besar (Eggins, 2002).



BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Analitik dan Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang selama bulan Juli sampai September 2008.

3.2. Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1. Bahan Penelitian

Bahan utama yang digunakan pada penelitian ini adalah urease yang diisolasi dari *Schizosaccharomyces pombe* 3054, dan dimurnikan dengan metode amonium sulfat dengan kejenuhan 30-45%. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah kitosan, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, natrium tartrat, CuSO_4 , CH_3COOH 2%, asam asetat glasial, CH_3COONa , NaOH , urea, PDA (*Potato Dektrose Agar*), pepton, ekstrak yeast, NaCl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, kasein, glutaraldehid 25%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan akuades.

3.2.2. 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, plat kaca ukuran 20 x 10 cm, cetakan plastik, peralatan gelas, serta tabung stainless steel pejal dengan panjang 10 cm dan diameter 1,5 cm.

3.3. Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan meliputi tahapan sebagai berikut:

1. Tahapan preparasi enzim dan larutan, yang terdiri dari isolasi urease dari *Schizosaccharomyces pombe* 3054, pemurnian ekstrak kasar urease dengan metode amonium sulfat, dan pembuatan berbagai larutan.
2. Pembuatan biosensor potensiometri urea, meliputi pembuatan membran kitosan, amobilisasi urease, dan perancangan biosensor potensiometri urea.
3. Penentuan pengaruh ketebalan membran kitosan terhadap kinerja biosensor potensiometri urea. Parameter yang diamati meliputi kepekaan, kisaran konsentrasi dan batas deteksi biosensor urea.
4. Penentuan karakter biosensor potensiometri urea. Karakter yang diamati adalah waktu respon, bilangan Nernst, batas deteksi, efisiensi, dan validasi biosensor terhadap sampel urin dari Laboratorium Klinik Melati .

3.4. Cara Kerja Penelitian

3.4.1. Preparasi Enzim dan Larutan

3.4.1.1. Isolasi urease dari *Schizosaccharomyces pombe* 3054

Isolasi urease dari *Schizosaccharomyces pombe* 3054 meliputi pembuatan media padat, pembuatan media cair, peremajaan kultur murni, pembuatan inokulum dan produksi urease. Cara kerja lengkap mengenai isolasi urease dari *Schizosaccharomyces pombe* 3054 disajikan pada Lampiran L.1.1.

3.4.1.2. Pemurnian ekstrak kasar urease

Pemurnian ekstrak kasar urease dilakukan dengan metode pengendapan bertingkat menggunakan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Pemurnian ekstrak kasar urease terdiri dari 3 tahapan yaitu pengendapan 0-30%, pengendapan 30-45 % dan dilanjutkan dengan dialisis. Cara kerja lengkap mengenai pemurnian ekstrak kasar urease disajikan pada Lampiran L.1.2.

3.4.1.3. Pembuatan berbagai larutan

Larutan yang dibuat dalam penelitian ini meliputi larutan yang digunakan untuk isolasi urease, larutan yang digunakan untuk pembuatan membran kitosan, larutan yang digunakan untuk analisis dengan biosensor urea dan larutan yang digunakan dalam penentuan kadar protein. Larutan yang digunakan dalam isolasi urease meliputi *buffer* fosfat 0,2 M, 0,07 M dan 0,03 M pH 8, *buffer* asetat pH 5,5, dan larutan urea 0,2 mM. Larutan yang digunakan dalam pembuatan membran kitosan meliputi asam asetat 0,8 %, glutaraldehid 1%, NaOH 1% dan asam asetat pH 4. Larutan yang digunakan dalam analisis dengan biosensor urea meliputi larutan *buffer* fosfat pH 7,3 sebagai pelarut urea, larutan urea 10^{-8} - 10^{-1} M, dan larutan urea 0 -10 ppm. Larutan yang digunakan untuk penentuan kadar protein meliputi reagen Biuret dan larutan kasein 1000 ppm. Pembuatan berbagai larutan secara lengkap disajikan pada Lampiran L.1.3.

3.4.2. Pembuatan Biosensor Potensiometri Urea

3.4.2.1. Pembuatan Membran Kitosan

Membran kitosan dibuat dengan menimbang kitosan sebanyak 0,1; 0,15; 0,2; 0,25 dan 0,3 gram, masing-masing dicampur dengan 10 ml asam asetat 0,8 %. Campuran diaduk menggunakan stirer selama 24 jam, selanjutnya ditambah dengan satu tetes glutaraldehid 1 % dan diaduk hingga homogen kurang lebih selama 2 jam. Larutan kitosan ini dituangkan dalam lempengan kaca berukuran 10 cm x 20 cm yang bagian tepinya telah diberi isolasi dan diratakan satu arah menggunakan tabung stainless steel dengan panjang 10 cm dan diameter 1,5 cm sebanyak satu kali. Membran di atas lempengan kaca dikeringkan pada temperatur 50°C. Setelah kering dicetak bulat dengan diameter 3,5 cm dan dilepas dari permukaan kaca menggunakan pinset dengan bantuan larutan NaOH 1% yang diteteskan di atas membran yang menempel kuat pada plat kaca. Skema kerja pembuatan membran kitosan disajikan pada Lampiran L.3.7.

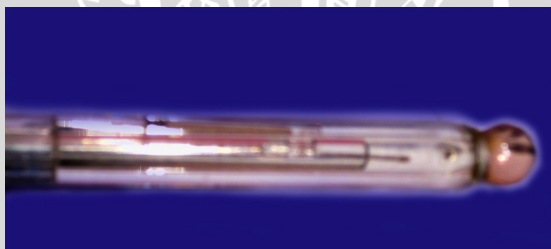
3.4.2.2. Amobilisasi Urease

Membran kitosan yang telah dicetak direndam dalam larutan NaOH 1% selama 30 menit kemudian dibilas dengan akuades. Selanjutnya, dicelupkan ke dalam larutan asam asetat pH 4 dan

dibilas kembali dengan akuades. Setelah itu direndam dalam 5 ml urease yang diisolasi dari *Schizosaccharomyces pombe* 3054, dan dimurnikan dengan metode amonium sulfat dengan kejenuhan 30 - 45 % selama 24 jam pada temperatur 4°C. Skema kerja amobilisasi urease disajikan pada Lampiran L.3.8.

3.4.2.3. Perancangan Biosensor Potensiometri Urea

Perancangan biosensor potensiometri urea dilakukan dengan melapisi permukaan elektroda gelas dengan urease yang diamobilisasi pada membran kitosan. Lapisan bawah membran (bagian yang bersentuhan dengan plat kaca saat membran dicetak) merupakan lapisan yang bersentuhan dengan membran elektroda gelas. Membran kitosan yang melekat pada permukaan elektroda gelas diikat dengan benang dan dicelupkan dalam akuades. Biosensor potensiometri urea hasil perancangan disajikan pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Biosensor Urea Hasil Perancangan

Langkah selanjutnya adalah kalibrasi biosensor potensiometri urea. Kalibrasi biosensor potensiometri urea dilakukan dengan mengukur E_{sel} larutan *buffer* pH 7,3 sampai diperoleh nilai potensial sel yang relatif konstan. Setelah itu biosensor potensiometri urea siap digunakan untuk pengukuran E_{sel} larutan urea. Pengukuran dilakukan dengan mencelupkan biosensor potensiometri urea ke dalam larutan urea 10^{-8} - 10^{-1} M, pH 7,3, dari konsentrasi rendah ke tinggi. Lama pengukuran setiap satu konsentrasi larutan adalah 6 menit, atau pada saat nilai E_{sel} yang ditunjukkan sudah konstan. Perubahan potensial sel (ΔE_{sel}) diperoleh dari selisih antara E_{sel} larutan urea hasil pengukuran dengan elektroda gelas tanpa urease yang teramobilkan pada membran kitosan dan elektroda gelas yang

sudah dilapisi dengan urease yang teramobilkan pada membran kitosan (biosensor urea). Skema kerja perancangan biosensor potensiometri urea dengan membran kitosan disajikan pada Lampiran L.3.10.

3.4.3. Penentuan Pengaruh Ketebalan Membran Kitosan Terhadap Kinerja Biosensor Potensiometri Urea

Penentuan pengaruh ketebalan membran kitosan yang digunakan sebagai media amobilisasi urease diteliti pada ketebalan 0,21 mm; 0,31 mm; 0,36 mm; 0,43 mm dan 0,46 mm. E_{sel} larutan urea pada konsentrasi 10^{-8} - 10^{-1} M pH 7,3 diukur dengan elektroda gelas tanpa urease yang teramobilkan pada membran kitosan, lalu dengan elektroda gelas yang sudah dilapisi dengan urease yang teramobilkan pada membran kitosan (biosensor urea), pada berbagai ketebalan membran kitosan. Larutan urea ditentukan E_{sel} nya dalam keadaan diaduk dengan stirer. Data E_{sel} yang diperoleh dianalisis sehingga bilangan Nernst, kisaran konsentrasi dan batas deteksi dari biosensor dengan berbagai ketebalan membran kitosan dapat ditentukan.

3.4.3.1. Penentuan Kepekaan Biosensor Potensiometri Urea

Kepekaan biosensor potensiometri urea ditunjukkan oleh bilangan Nernst. Bilangan Nernst ini diperoleh dari kemiringan kurva hubungan antara ΔE_{sel} dengan $\log [\text{urea}]$ pada kisaran konsentrasi biosensor urea. Pada kisaran konsentrasi tersebut dibuat persamaan linier $y = ax + b$. Kepekaan biosensor ditunjukkan oleh nilai a . Secara teoritis, nilai a untuk biosensor potensiometri urea dengan transduser sensor H^+ sebesar 29,6 mV/dekade. Apabila bilangan Nernst hasil pengukuran mendekati atau sama dengan 29,6 mV/dekade, maka dapat dikatakan bahwa biosensor potensiometri urea mempunyai kepekaan yang tinggi.

3.4.3.2. Penentuan Kisaran Konsentrasi dan Batas Deteksi Biosensor Potensiometri Urea

Kisaran konsentrasi dan batas deteksi biosensor potensiometri urea ditentukan berdasar pada kurva hubungan antara ΔE_{sel} dengan $\log [\text{urea}]$. Dari kurva tersebut, akan diketahui daerah yang menunjukkan hubungan linier ΔE_{sel} dan $\log [\text{urea}]$. Rentang konsentrasi urea pada daerah ini, menunjukkan kisaran konsentrasi

urea yang masih dapat dideteksi oleh biosensor urea secara kuantitatif.

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

3.4.4. Penentuan Karakter Biosensor Potensiometri Urea

3.4.4.1. Penentuan Waktu Respon Biosensor Potensiometri Urea

Penentuan waktu respon dilakukan dengan membuat kurva hubungan antara waktu dan E_{sel} larutan urea. Kurva tersebut diperoleh dari hasil pengukuran E_{sel} larutan urea pada konsentrasi 0,06-6 ppm. Pengukuran dilakukan pada kondisi optimum biosensor potensiometri urea. Dari hasil penelitian ini, kondisi optimum terdapat pada biosensor potensiometri urea dengan ketebalan membran kitosan 0,21 mm. Pada saat melakukan pengukuran, dicatat harga E_{sel} larutan urea setiap 10 detik. Pencatatan dilakukan selama 360 detik. Kemudian, dibuat kurva hubungan antara E_{sel} larutan urea terhadap waktu. Dari kurva tersebut, dapat ditentukan waktu respon biosensor urea. Waktu respon ini ditunjukkan oleh waktu dimana E_{sel} larutan urea mulai tetap.

3.4.4.2. Penentuan Efisiensi Biosensor Potensiometri Urea

Penentuan efisiensi biosensor potensiometri urea dilakukan dengan mengukur E_{sel} larutan urea 0 - 10 ppm secara berulang-ulang. Pengukuran dilakukan pada kondisi optimum biosensor potensiometri urea. Dari hasil penelitian ini, kondisi optimum terdapat pada biosensor potensiometri urea dengan ketebalan membran kitosan 0,21 mm. Pada sederet larutan 0-10 ppm (8 sampel), dilakukan pengukuran E_{sel} sebanyak 6 kali sehingga total pemakaian biosensor urea sebanyak 48 kali pengukuran. Selanjutnya, dibuat kurva hubungan antara pengulangan dengan E_{sel} larutan urea, dan diamati hingga pengukuran keberapa biosensor masih dapat memberikan bilangan Nernst yang mendekati nilai teoritis, yaitu $29,6 \pm 2,96$ mV/dekade .

3.4.4.3. Penentuan Validasi Biosensor Potensiometri Urea

Penentuan validasi biosensor potensiometri urea terhadap sampel urin dilakukan dengan mengukur ΔE_{sel} 3 sampel urin yang didapat dari Laboratorium Klinik Melati. Sampel urin ini diencerkan 10 dan 100 kali dengan larutan *buffer* fosfat pH 7,3. ΔE_{sel} merupakan selisih antara E_{sel} hasil pengukuran dengan elektroda gelas sensor pH tanpa dilapisi urease yang teramobilkan pada membran kitosan, dan E_{sel} hasil pengukuran dengan elektroda gelas sensor pH yang permukaannya dilapisi urease teramobilisasi pada membran kitosan 0,21mm. Selanjutnya harga ΔE_{sel} diplotkan ke kurva baku sehingga didapatkan kadar urea yang terukur. Kadar urea yang terukur dengan biosensor dibandingkan dengan kadar urea yang terukur di Laboratorium Klinik Melati.



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Pembuatan Biosensor Potensiometri Urea

Biosensor potensiometri urea dibuat sesuai dengan metode 3.4.2, yaitu melapisi permukaan elektroda gelas sensor pH dengan urease yang teramobilisasi pada membran kitosan. Urease yang digunakan diisolasi dari *Schizosaccharomyces pombe* 3054 sesuai Lampiran 1.1, dan dimurnikan dengan metode amonium sulfat dengan kejenuhan 30-45 % sesuai dengan Lampiran 1.2.

Mekanisme kerja biosensor potensiometri urea didasarkan pada reaksi hidrolisis urea menjadi CO_2 dan NH_3 . Pada saat elektroda gelas yang dilapisi dengan urease amobil dicelupkan ke dalam larutan urea, hasil reaksi hidrolisis akan berdifusi melalui membran ke permukaan elektroda gelas. Baik CO_2 dan NH_3 memiliki kemungkinan untuk sampai ke transduser. Pada pH 7,3 CO_2 terlarut sebagai ion H^+ dan HCO_3^- , sedangkan NH_3 terlarut sebagai ion NH_4^+ dan OH^- . Persamaan 2.1 menunjukkan bahwa harga E_{sel} akan meningkat jika larutan yang diukur mengalami peningkatan keasaman dan sebaliknya, jika larutan yang diukur mengalami penurunan keasaman. Berdasarkan hal itu, jika hasil reaksi yang terdeteksi oleh transduser adalah molekul CO_2 , maka akan meningkatkan harga E_{sel} . Akan tetapi, E_{sel} akan menurun jika yang terdeteksi oleh transduser berupa molekul NH_3 .

Data E_{sel} hasil pengukuran dengan biosensor potensiometri urea pada berbagai ketebalan membran disajikan pada Lampiran 4. Tabel 4.1 adalah data selisih potensial (ΔE_{sel}) larutan urea 10^{-8} - 10^{-1}M antara hasil pengukuran dengan biosensor dan potensial hasil pengukuran dengan elektroda gelas. Pada Tabel 4.1, dapat dilihat bahwa E_{sel} hasil pengukuran dengan biosensor lebih positif daripada E_{sel} hasil pengukuran dengan elektroda gelas. Hal tersebut menunjukkan bahwa molekul yang sampai ke transduser kemungkinan adalah CO_2 .

Molekul CO_2 dalam air membentuk H_2CO_3 yang bersifat asam, sedangkan NH_3 di dalam air membentuk NH_4OH yang bersifat basa. Membran kitosan merupakan suatu membran yang bersifat

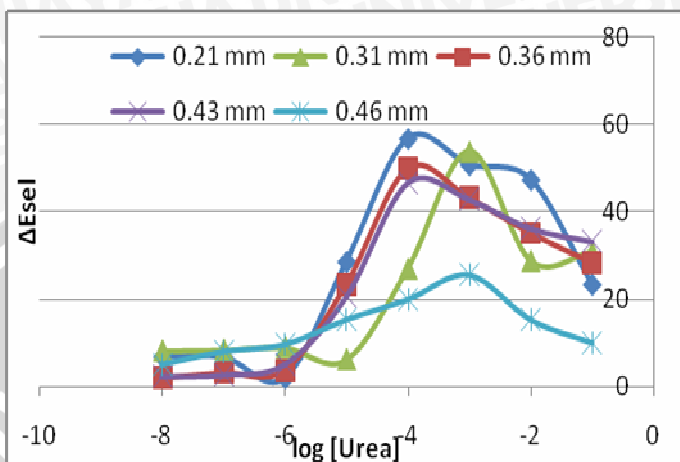
basa karena memiliki gugus-gugus NH_2 , sehingga cenderung lebih mudah dilewati oleh molekul yang bersifat asam, dalam hal ini adalah CO_2 . Permeasi pada membran kitosan meningkat dengan keberadaan NH_3 yang meningkatkan kebasaaan membran (Ito, 1997).

Tabel 4.1 Potensial Sel Larutan Urea 10^{-8} - 10^{-1} M yang Terukur Oleh Elektroda Gelas dan Biosensor Potensiometri Urea dengan Ketebalan Membran Kitosan 0,21 mm

[urea] (M)	E_{sel} Elektroda gelas (mV)	E_{sel} Biosensor (mV)	ΔE_{sel} (mV)
10^{-1}	-36,6	-13,2	23,4
10^{-2}	-36,6	10,8	47,4
10^{-3}	-36,6	14,2	50,8
10^{-4}	-36,4	20,4	56,8
10^{-5}	-36,4	-7,8	28,6
10^{-6}	-36,4	-35,2	1,2
10^{-7}	-36,4	-29,6	6,8
10^{-8}	-36,4	-29,6	6,8

4.2. Pengaruh Ketebalan Membran Kitosan Terhadap Kinerja Biosensor Potensiometri Urea

Pengaruh ketebalan membran kitosan terhadap kinerja biosensor potensiometri urea ditentukan dengan metode 3.4.3, hasil penelitian ditunjukkan pada Gambar 4.1. Pada Gambar 4.1 dapat dilihat bahwa profil hubungan antara ΔE_{sel} dengan $\log [\text{urea}]$ pada biosensor potensiometri urea dengan berbagai ketebalan membran hampir sama. Harga ΔE_{sel} relatif tetap pada konsentrasi urea yang rendah, selanjutnya meningkat tajam dan mengalami penurunan pada konsentrasi yang tinggi. Daerah konsentrasi di mana harga ΔE_{sel} meningkat tajam merupakan kisaran konsentrasi atau biasa disebut dengan daerah linier. Kemiringan garis pada daerah linier menunjukkan kepekaan dari biosensor potensiometri urea yang disebut dengan bilangan Nernst.



Gambar 4.1 Kurva Hubungan ΔE_{sel} dengan $\text{Log} [\text{urea}]$ pada Berbagai Ketebalan Membran

Pada Tabel 4.2, yaitu tabel yang menyajikan bilangan Nernst, kesalahan pengukuran, jumlah dan konsentrasi urease teramobilkan pada berbagai ketebalan membran, dapat dilihat bahwa harga bilangan Nernst berbeda pada setiap ketebalan membran yang dipelajari. Harga bilangan Nernst yang paling mendekati teoritis (29,6 mV/dekade) dihasilkan oleh biosensor dengan ketebalan membran 0,21 mm, dengan kesalahan 7,43%. Hal ini menunjukkan bahwa kepekaan biosensor tersebut paling baik. Salah satu faktor yang mempengaruhi kepekaan biosensor adalah aktivitas enzim yang teramobilkan. Kepekaan biosensor semakin baik jika aktivitas enzim yang teramobilkan tinggi. Aktivitas urease fraksi 30-45 % adalah $0,733 \mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1}$ (Agustina, 2006). Berdasarkan Lehninger (1991), aktivitas sebanding dengan jumlah enzim. Jadi, secara teoritis kepekaan biosensor akan meningkat sesuai peningkatan jumlah enzim. Namun, hasil penelitian menunjukkan yang sebaliknya. Pada membran kitosan yang tebal, kerapatan enzim yang teramobilkan tinggi akibatnya laju difusi hasil reaksi untuk menuju transduser terhalang sehingga kepekaan biosensor menurun.

Tabel 4.2 Bilangan Nernst, Kesalahan Pengukuran, Jumlah Urease dan Konsentrasi Urease Teramobilkan pada Berbagai Ketebalan Membran

Ketebalan Membran (mm)	Bilangan Nernst (mv/dekade)	Kesalahan Pengukuran (%)	Jumlah Urease Amobil (mg)	Konsentrasi Urease Amobil (mg/cm ³)
0,21	27,4	7,43	3,390	16,774
0,31	23,8	19,59	5,286	17,714
0,36	23,1	21,96	6,295	18,167
0,43	20,7	30,07	8,148	19,686
0,46	4,143	86,00	10,206	23,064

Jumlah enzim yang teramobilkan ditentukan sesuai Lampiran 2.3. Pada Tabel 4.2, dapat dilihat bahwa jumlah enzim yang teramobilkan meningkat jika ketebalan membran meningkat. Hal ini menunjukkan bahwa enzim tidak hanya teramobilkan secara adsorpsi fisik atau terikat di permukaan membran saja. Jika hanya terikat di permukaan, maka jumlah enzim yang teramobilkan pada setiap ketebalan akan sama sebab luas setiap membran dengan berbagai ketebalan sama. Kemungkinan besar enzim juga teramobilkan dengan masuk ke pori-pori membran.

Parameter kinerja biosensor yang lain yaitu, kisaran konsentrasi dan batas deteksi biosensor urea pada berbagai ketebalan membran disajikan pada Tabel 4.3. Berdasarkan Tabel 4.3, kisaran konsentrasi dan batas deteksi pada biosensor dengan ketebalan membran kitosan 0,21mm, 0,36 mm dan 0,43 mm hampir sama. Biosensor dengan ketebalan membran kitosan 0,31 mm dan 0,46 mm berbeda. Kisaran konsentrasi terlebar justru dihasilkan oleh biosensor dengan ketebalan membran paling tinggi yaitu 0,46 mm, akan tetapi kepekaan biosensor ini paling rendah. Jadi, pada kondisi kisaran konsentrasi pengukuran paling lebar dan batas deteksi paling rendah belum tentu dihasilkan bilangan Nernst yang mendekati harga ideal.

Tabel 4.3 Kisaran Konsentrasi dan Batas Deteksi Biosensor Potensiometri Urea pada Berbagai Ketebalan Membran Kitosan

Ketebalan Membran (mm)	Kisaran Konsentrasi	Batas Deteksi
0,21	10^{-6} - 10^{-4} M	$1,088 \times 10^{-6}$ M
0,31	10^{-5} - 10^{-3} M	$1,201 \times 10^{-5}$ M
0,36	10^{-6} - 10^{-4} M	$1,144 \times 10^{-6}$ M
0,43	10^{-6} - 10^{-4} M	$1,190 \times 10^{-6}$ M
0,46	10^{-8} - 10^{-3} M	$1,000 \times 10^{-8}$ M

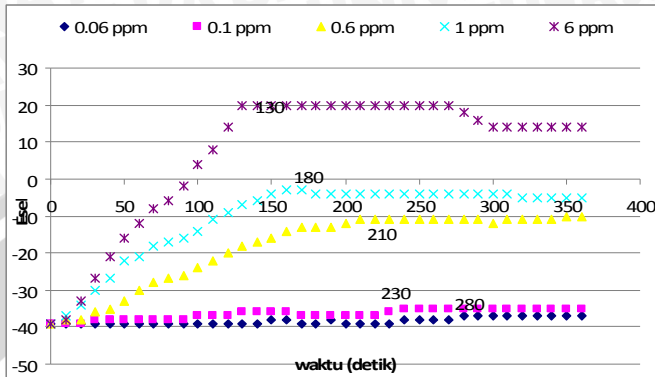
Berdasarkan teori, semakin besar jumlah substrat maka kecepatan reaksi hidrolisis oleh enzim akan semakin besar, namun ini hanya sampai V_m tercapai, selanjutnya penambahan substrat sebanyak apapun tidak akan meningkatkan kecepatan reaksi (Lehninger, 1991). Berdasarkan kurva hubungan konsentrasi substrat dan kecepatan reaksi pada Gambar 2.3, kisaran konsentrasi urea yang dapat dideteksi oleh biosensor urea, termasuk dalam daerah linier, di bawah nilai K_M urease (0,2065mM) (Hidayati, 2006).

4.3. Karakter Biosensor Potensiometri Urea

Dari analisa tentang pengaruh ketebalan membran kitosan terhadap kinerja biosensor potensiometri urea, didapatkan hasil bahwa kinerja biosensor terbaik didapat pada ketebalan membran yang paling rendah yakni 0,21 mm. Biosensor potensiometri urea dengan kinerja terbaik ini diuji untuk mengetahui karakternya yang meliputi waktu respon, efisiensi dan validitas atau ketepatan pengukuran.

4.3.1. Waktu Respon Biosensor Potensiometri Urea

Biosensor urea membutuhkan waktu tertentu untuk dapat merespon urea dalam larutan. Waktu respon biosensor potensiometri urea dalam penelitian ini ditentukan dengan mengukur waktu yang diperlukan biosensor untuk memberikan potensial sel yang tetap (stabil) sesuai metode 3.4.4.1.



Gambar 4.2 Kurva Hubungan E_{sel} Larutan Urea 0,06-6 ppm dan Waktu Pengukuran

Pada Gambar 4.2 dapat dilihat bahwa pada daerah kisaran konsentrasi yakni 0,06 ; 0,1 ; 0,6 ; 1; dan 6 ppm waktu respon yang dibutuhkan adalah 280; 230; 210; 180; dan 130 detik. Jadi, secara umum waktu respon biosensor potensiometri urea adalah 280 detik. Waktu respon dipengaruhi oleh konsentrasi substrat. Pada konsentrasi urea tinggi waktu respon cepat, dan sebaliknya pada konsentrasi yang rendah. Hal ini sesuai dengan teori bahwa pada daerah linier, yaitu daerah antara 0 sampai $\frac{1}{2} V_m$ pada Gambar 2.3, peningkatan konsentrasi substrat akan meningkatkan laju reaksi.

4.3.2. Efisiensi Biosensor Potensiometri Urea

Efisiensi biosensor potensiometri urea ditentukan sesuai metode 3.4.4.2. Bilangan Nernst untuk setiap pengukuran disajikan pada Tabel 4.4. Pada Tabel 4.4 dapat dilihat bahwa pada pengukuran kedua, bilangan Nernst yang dicapai 28,47 mV/dekade dengan kesalahan teoritis 3,82% dan lebih baik daripada bilangan Nernst pada pengukuran pertama. Hal ini disebabkan pori-pori bagian dalam membran yang terhubung dengan transduser sudah lebih terbuka sehingga hasil reaksi antara urea dan urease dapat sampai ke transduser dengan baik. Pada saat pengukuran pertama, pori-pori bagian dalam masih belum terlalu terbuka sehingga tidak semua hasil reaksi dapat sampai ke transduser. Kemudian pada pengukuran selanjutnya bilangan Nernst semakin menjauhi nilai teoritis. Hal ini

disebabkan jumlah enzim yang teramobilisasi pada membran semakin berkurang akibat lepas kembali ke larutan, sehingga reaksi antara urease dan urea tidak berjalan sempurna.

Tabel 4.4 Perubahan Bilangan Nernst dan Kesalahan Pengukuran pada Pengulangan Pemakaian Biosensor yang Diaplikasikan pada 8 Variasi Konsentrasi Urea

Ulangan	Pengukuran biosensor	bilangan Nernst (mV/dekade)	Kesalahan pengukuran (%)
1	8 kali	27,94	5,61
2	16 kali	28,47	3,82
3	24 kali	27,92	5,68
4	32 kali	26,67	9,88
5	40 kali	22,69	23,34
6	48 kali	7,86	73,43

Biosensor potensiometri urea dikatakan masih bekerja dengan baik apabila kesalahan teoritis yang terjadi selama pengukuran kurang dari 10 % (Evans, 1991). Dari Tabel 4.4, dapat disimpulkan bahwa efisiensi biosensor urea hasil perancangan adalah 32 kali pengukuran sampel. Kisaran konsentrasi dari biosensor potensiometri urea dengan membran kitosan 0,21 mm adalah 0,06 hingga 6 ppm dengan batas deteksi 0,073 ppm. Kemampuan biosensor urea mengukur hingga 32 kali mengindikasikan bahwa urease yang teramobilkan pada membran kitosan tidak mudah lepas, sehingga kemungkinan besar urease tidak hanya terikat dengan metode adsorpsi fisik melainkan juga masuk ke dalam pori membran kitosan.

4.3.3. Validitas

Validasi atau ketepatan pengukuran biosensor urea ditentukan sesuai metode 3.4.4.3. Kurva baku hubungan ΔE_{sel} dan log urea yang digunakan untuk menentukan kadar sampel disajikan pada Lampiran 8. Kadar urea dalam urin yang merupakan hasil pengukuran Laboratorium Klinik Melati, kadar urea yang terukur dengan biosensor urea dan kesalahan pengukuran disajikan pada Tabel 4.5

Tabel 4.5 Perbandingan Kadar Urea dalam Urin Hasil Pengukuran Laboratorium Klinik Melati Terhadap Kadar Urea yang Terukur dengan Biosensor Urea dan Kesalahan Pengukuran

C Urea Lab Klinik Melati (ppm)	Pengenceran 10x		Pengenceran 100x	
	C urea (ppm)	Kesalahan (%)	C urea (ppm)	Kesalahan (%)
23,5	22,8	2,98	22,7	3,41
30	29,3	2,33	28,7	4,33
45	43,5	3,33	43,3	3,78

Berdasarkan Tabel 4.5, pengenceran 100 kali memberikan kesalahan yang lebih besar daripada pengenceran 10 kali. Artinya, pada daerah kisaran konsentrasi biosensor lebih peka terhadap konsentrasi yang tinggi daripada konsentrasi yang rendah. Hal ini sesuai teori Michaelis Menten bahwa kecepatan reaksi meningkat jika konsentrasi substrat meningkat. Suatu alat ukur memiliki ketepatan yang baik jika mempunyai kesalahan relatif lebih kecil dari 5 % atau ketepatan pengukuran lebih besar dari 95% (Evans, 1991). Berdasarkan hasil penentuan validasi, dapat dikatakan bahwa biosensor potensiometri urea dengan ketebalan membran kitosan 0,21 mm mempunyai kinerja yang baik dengan kesalahan relatif 2 hingga 4 % atau ketepatan pengukuran 96 hingga 98%.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat ditarik kesimpulan bahwa

1. Biosensor potensiometri urea dapat dibuat dengan menggunakan membran kitosan sebagai media amobilisasi urease.
2. Ketebalan membran kitosan berpengaruh terhadap kinerja biosensor potensiometri urea. Kinerja biosensor potensiometri urea yang terbaik dihasilkan pada ketebalan membran yang rendah yaitu 0,21 mm. Biosensor potensiometri urea tersebut memiliki bilangan Nernst 28,47 mV/dekade, kisaran konsentrasi 0,06 hingga 6 ppm, dan batas deteksi 0,073 ppm.
3. Karakter biosensor potensiometri urea dengan ketebalan membran kitosan 0,21 mm adalah: waktu respon 280 detik, efisiensi pengukuran 32 kali, dan ketepatan pengukuran 96 % hingga 98 %.

5.2. Saran

Pada penelitian selanjutnya perlu dikaji tentang kinerja biosensor urea dengan ketebalan membran yang lebih kecil dari 0,21 mm dan perlu ditentukan aktivitas urease yang teramobilkan pada setiap membran.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustina, W. 2006. **Pemurnian dan Karakterisasi Urease Hasil Isolasi dari *Schizosaccharomyces pombe* 3054**. Skripsi Sarjana, Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya. Malang.
- Ayhan, F., Ayhan, H., Piskin, E dan Tanyolac. 2002. **Optimization of Urease Immobilization onto Non-porous HEMA Incorporated Poly (EGDMA) Microbeads and Estimation of Kinetic Parameters**. <http://lib. Bioinfo.pl/pmid: 11762905>, tanggal akses: 20 April 2008.
- Baronas, R., Ivanauskas, F., dan Kulys. 2003. **The Influence of The Enzyme Membrane Thickness on The Response of Amperometric Biosensors**. *Sensors*. 3: 248-262.
- Bennington, J.L. 1984. **Dictionary and Encyclopedia of Laboratory Medicine and Technology**. W.B. Saunders Co. Philadelphia.
- Chaplin, M. 2004. **Potentiometric Biosensors**. Faculty of Engineering, Science and The Built Environment, South Bank University. London.
- Chauvan, S., V. Rai dan H.B. Singh. 2004. **Biosensors**. *Resonance Magz*. 12: 33-44.
- Eggenstein C, Borchardt M, Diekmann C, Gründig B, Dumschat C, Cammann K, Knoll M, Spener F. 1999. **A Disposable Biosensor for Urea Determination in Blood Based on an Ammonium-Sensitive Transducer**. 14: 33-41.
- Eggins, B. 2002. **Chemical Sensors and Biosensors**. John Wiley and Sons. New York.
- Evans, A. 1991. **Potentiometry and Ion Selective Electrodes**. John Wiley and Sons. New York.
- Fennema, O.R. 1996, **Food Chemistry, 3rd ed**. Marcell Dekker. New York.
- Gu,Z.Y, Xue, and Li. 2001. **Preparation of The Porous Chitosan Membrane by Cryogenic Induced Phase Separation**, *Polymer of Advanced Technology*. 53: 665-669.
- Harris, 2000. **Electroanalytical Methods**. Oxica Group. London.

- Hidayati, E. 2006. **Karakterisasi Enzim Urease dari *Schizosaccharomyces pombe* 3054**. Skripsi Sarjana, Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya. Malang.
- Imron, T.A. 2008. **Uji Aktivitas Urease**, <http://cyberbiology.blogspot.com>, tanggal akses: 22 April 2008.
- Ito, A, Sato, and Anma.1997. **Permeability of CO₂ Through Chitosan Membrane Swollen by Water Vapor in Feed Gas**, Die Angewadndte Makromolekulare Chemie. 268: 85-94.
- Julianto, A. 2007. **Pembuatan Biosensor Urea Berdasarkan Optimasi Masa Urease Amobil**. Skripsi Sarjana, Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya. Malang.
- Lehninger, A.L. 1991. **Dasar-Dasar Biokimia**, Jilid 1. Terjemahan Therawijaya, Erlangga. Jakarta.
- 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.
- Martoharsono. 1984. **Biokimia**. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Mohanty, S.P. 2001. **Biosensors: A Survey Report**. Dept. of Comp. Science and Engineering, University of South Flourida. pp. 2-8.
- Pasaribu, N. 2004. **Berbagai Ragam Pemanfaatan Polimer**, Jurusan Kimia Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Pijanowska, D.G., and Torbicz, W. 2000. **Biosensors for Bioanalytical Applications**. Bulletin of The Polish Academy Of Sciences, Technical Science. Vol. 53, No. 3, pp. 251-260
- Pijanowska, D.G., Dawgul, M., and Torbich, W.2005. **Comparison of Urea Determination in Biological Samples by Enfets Based on pH and pNH₄ Detection**. Institute of Biocybernetics and Biomedical Engineering, www.mdpi.net, tanggal akses: 14 April 2008.
- Sacher, R.A, Richard, A. 2005. **Tinjauan Klinis Hasil Pemeriksaan Laboratorium**. EGC. Jakarta.
- Smith, J.E. 1995. **Bioteknologi**. Alih bahasa: Danry. Gramedia. Jakarta.

- Suhartono, M.T. 1989. **Enzim dan Bioteknologi**. Pusat Antar Universitas Bioteknologi, IPB. Bogor.
- Wang, J. 2000. **Analytical Electrochemistry**, 2nd ed. John Willey and Sons, Inc. New York.
- Wicaksono, D. H. B. 2000. **Biosensor Introduction**.Tokyo Institute of Technology. Jepang. 79-80
- Williams. 1993. **Sensor dan Tranduser**. <http://www.physics.org>, tanggal akses: 2 Mei 2008
- Xiaoli, and Dagang. 2005. **Preparation and Characterization of Porous Chitosan Membranes and The Localization of The Activity of Urease Immobilized on it by SEM and X-ray Microanalysis**. <http://www.chemistrymag.org>. tanggal akses: 27 April 2008
- Yahya, P.K.I. 2007. **Pembuatan Biosensor Urea dan Karakterisasinya Berdasarkan Pengaruh pH Larutan Analit**. Skripsi Sarjana, Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya. Malang.
- Yun, Dong-Hwa, dan Suk-In Hong.2005. **Highly Sensitive and Renewable Amperometric Urea Sensor Based on Self-Assembled Monolayer Using Porous Silicon Substrate**. Journal of the Korean Physical Society. Vol. 47: 445-449.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Preparasi Enzim dan Larutan

L.1.1. Isolasi Urease dari *Schizosaccharomyces pombe* 3054

L.1.1.1. Penyiapan Media

Media yang perlu disiapkan adalah media padat untuk peremajaan kultur murni dan media cair untuk pembuatan *Schizosaccharomyces pombe* 3054.

1. Pembuatan Media Padat

Media yang digunakan adalah *Potato Dekstrose Agar* (PDA) dengan komposisi kentang 50 gram, dekstrosa 4 gram, dan agar 4 gram. Kentang yang diiris tipis direbus dalam akuades 200 ml, kemudian disaring dengan kain saring. Dekstrosa dan agar dilarutkan ke dalam filtrat dan dipanaskan hingga larut. Kemudian pH diatur pada pH 5,50 dengan penambahan asam asetat. Kemudian ditambahkan 10,0 ml *buffer* asetat pH 5,50. Selanjutnya larutan dituangkan pada tabung reaksi kurang lebih 5,0 ml disterilkan dalam autoklav 5 jam. Setelah itu tabung diletakkan pada posisi miring dan dibiarkan memadat.

2. Pembuatan Media Cair

2,50 gram pepton, 1,25 gram ekstrak yeast, 1,25 gram NaCl, 2,5 gram Dekstrosa, dan 4 gram $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, dilarutkan dalam 250 ml akuades dan ditambahkan 2,5 ml urea 0,20 mM. kemudian diatur pHnya hingga 5,50 dengan menambahkan asam asetat. Kemudian ditambah *buffer* asetat pH 5,5 dan larutan tersebut disterilkan dalam autoklav 5 jam.

L.1.1.2. Peremajaan Kultur Murni

Mikroba dari biakan murni dipindahkan sebanyak satu ose ke dalam PDA steril yang telah disiapkan. Untuk menghindari kontaminasi dari luar maka mulut tabung reaksi disterilkan dengan pembakar bunsen. Kemudian diinkubasi selama 4 hari pada suhu 30°C dalam inkubator.

L.1.1.3. Pembuatan Inokulum

Kapang yang telah tumbuh dalam media padat PDA miring yang berumur 4 hari diencerkan dengan 10 ml akuades steril, kemudian dikocok. Suspensi spora ini berfungsi sebagai inokulum.

L.1.1.4. Isolasi Urease dari *Schizosaccharomyces pombe* 3054

Produksi urease dilakukan dengan cara memindahkan larutan inokulum masing-masing sebanyak 5 ml pada 150 ml media cair, diletakkan di atas shaker 150 rpm pada suhu ruang selama 48 jam.

L.1.2. Pemurnian Ekstrak Kasar Urease

Ekstrak kasar urease dimurnikan dengan cara pengendapan bertingkat menggunakan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dengan fraksi 0-30%, 30-45% dan proses dialisis.

1. Pengendapan 0-30%

Ditimbang 7,04 gram $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, kemudian ditambahkan ke dalam 40 mL larutan ekstrak kasar urease. Penambahan dilakukan sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan menggunakan gelas pengaduk. Setelah semua $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yang ditambahkan larut, kemudian dibiarkan 1 jam. Endapan enzim dipisahkan dengan sentrifugasi menggunakan kecepatan 3000 rpm, pada suhu 4°C selama 35 menit. Dihasilkan supernatan I dan endapan I.

2. Pengendapan 30-45%

Ditimbang 3,312 gram $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, kemudian ditambahkan ke dalam supernatan I. Penambahan dilakukan sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan menggunakan gelas pengaduk. Setelah semua $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yang ditambahkan larut, kemudian dibiarkan 1 jam. Endapan enzim dipisahkan dengan sentrifugasi menggunakan kecepatan 3000 rpm, pada suhu 4°C selama 35 menit. Dihasilkan supernatan II dan endapan II.

3. Dialisis

Endapan II dilarutkan dalam 5 mL larutan *buffer* fosfat 0,2 M pH 8. Endapan yang larut dimasukkan ke dalam selofan dan selajutnya didialisis dengan cara merendam selofan dalam 500 mL larutan *buffer* fosfat 0,07 M pH 8 pada posisi tergantung. Dialisis dilakukan selama 6 jam dengan mengganti *buffer* fosfat 0,03 M pH 8 setelah 3 jam. Untuk mengetahui bahwa dialisis sudah selesai, *buffer* diuji dengan larutan HCl 0,1 M dan BaCl₂, caranya 2 mL *buffer* dimasukkan dalam tabung reaksi ditambah dengan 1 mL HCl 0,01 M dan beberapa tetes BaCl₂. Apabila sudah tidak terbentuk endapan putih BaSO₄ maka dialisis dihentikan.

L.1.3. Pembuatan Berbagai Larutan

L.1.3.1. Larutan Na₂HPO₄ 0,2 M

Berat padatan yang diperlukan untuk membuat larutan Na₂HPO₄.2H₂O 0,2 M sebanyak 500 mL, adalah:

$$\begin{aligned}\text{Berat Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O} &= 178 \text{ g/mol} \times 0,2 \text{ mol/L} \times 0,5 \text{ L} \\ &= 17,8 \text{ gram}\end{aligned}$$

Ditimbang 17,8 gram padatan Na₂HPO₄.2H₂O, dilarutkan dengan akuades dalam gelas kimia 100 mL, selanjutnya dituang dalam labu ukur 500 mL dan diencerkan dengan akuades hingga tanda batas.

L.1.3.2. Larutan NaH₂PO₄ 0,2 M

Untuk mendapatkan 500 mL larutan NaH₂PO₄.H₂O 0,2 M, berat padatan NaH₂PO₄.H₂O yang harus ditimbang adalah:

$$\begin{aligned}\text{Berat NaH}_2\text{PO}_4\cdot \text{H}_2\text{O} &= 138 \text{ g/mol} \times 0,2 \text{ mol/L} \times 0,5 \text{ L} \\ &= 13,8 \text{ gram}\end{aligned}$$

Ditimbang 13,8 gram padatan NaH₂PO₄.H₂O dilarutkan dengan akuades dalam gelas kimia 100 mL, dituang ke dalam labu ukur 500 mL kemudian diencerkan dengan akuades sampai tanda batas.

L.1.3.3. Larutan *buffer* fosfat 0,2 M pH 7,3 dan pH 8

Prinsip perhitungan untuk membuat *buffer* fosfat pH 7,3 yaitu:

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

$$\text{Log} \left(\frac{[\text{Basa Konjugat}]}{[\text{Asam}]} \right) = \text{pH} - \text{pK}_a$$

$$= 7,3 - 7,21 = 0,09$$

$$7,3 = 7,21 + \log \frac{[\text{Na}_2\text{HPO}_4]}{[\text{NaH}_2\text{PO}_4]}$$

$$7,3 = 7,21 + \log a$$

$$\log a = 7,3 - 7,21 = 0,09$$

$$a = 1,2303$$

$$\frac{[\text{Na}_2\text{HPO}_4]}{[\text{NaH}_2\text{PO}_4]} = 1,2303$$

$$[\text{Na}_2\text{HPO}_4] = 1,2303 [\text{NaH}_2\text{PO}_4]$$

$$V \text{Na}_2\text{HPO}_4 = 1,2303 V \text{NaH}_2\text{PO}_4$$

$$V_{\text{total}} = V \text{Na}_2\text{HPO}_4 + V \text{NaH}_2\text{PO}_4$$

$$V_{\text{total}} = 2,2303 V \text{NaH}_2\text{PO}_4$$

- $V \text{NaH}_2\text{PO}_4 = \frac{1}{2,2303} \times 100 \text{ ml} = 44,8 \text{ mL}$
- $V \text{Na}_2\text{HPO}_4 = 100 \text{ ml} - 44,8 \text{ ml} = 55,2 \text{ mL}$

Untuk memperoleh larutan *buffer* fosfat dengan pH 7,3 sebanyak 100 mL dilakukan pencampuran 44,8 mL larutan $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,2 M dengan 55,2 mL larutan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2 M sambil dilakukan pengadukan dan dengan menggunakan pH meter diatur pH larutan hingga 7,3. Sedangkan *buffer* pH 8 dibuat dengan mencampurkan 14 ml larutan $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,2 M dengan 86 ml larutan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2 M. Berikut ini adalah tabel hubungan pH *buffer* fosfat, volume $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ yang dicampurkan.

pH	V Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O 0,2 M (ml)	V NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O 0,2 M (ml)
7,3	55,2	44,8
8,0	86,0	14,0

L.1.3.4. Larutan Asam Asetat 0,2 M

Untuk membuat larutan CH₃COOH 0,2 M sebanyak 100 mL, yang diperlukan adalah:

$$BJ = 1,05 \text{ kg/L}$$

$$= 1,05 \cdot 10^3 \text{ g/L}$$

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

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

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

L.1.3.5 Larutan Natrium Asetat 0,2 M

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 kemudian dilarutkan dalam gelas kimia 100 mL. Lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian diencerkan dengan akuades sampai tanda batas sehingga diperoleh larutan Na-asetat 0,2 M.

L.1.3.6. Larutan Buffer Asetat 0,2 pH 5,5

Untuk memperoleh larutan *buffer* asetat dengan pH 5,5 sebanyak 100 mL dilakukan dengan cara, dimasukkan 15 mL larutan asam asetat

0,2 M dalam gelas kimia kemudian elektroda pH meter dimasukkan ke dalam larutan tersebut. Selanjutnya ditambahkan natrium asetat 0,2 M sampai pH 5,5 yang ditunjukkan oleh pH meter. Kemudian campuran tersebut diencerkan dengan akuades hingga 100 mL di mana pH dipertahankan pada pH 5,5 dengan menambahkan asam asetat atau natrium asetat.

L.1.3.7. Pembuatan larutan urea berbagai konsentrasi

L.1.3.7.1. Pembuatan Larutan Urea 10^{-1} M

Untuk membuat 100 ml urea 10^{-1} M , berat padatan urea yang ditimbang adalah

$$\begin{aligned}\text{Berat urea} &= 10^{-1} \text{ mol/L} \times 0,1 \text{ L} \times 60 \text{ gram/mol} \\ &= 0,6 \text{ gram}\end{aligned}$$

Ditimbang 0,6 gram padatan urea. 0,6 gram urea dilarutkan ke dalam 20 mL *buffer* fosfat pH 7,3 dalam gelas kimia, kemudian secara kuantitatif dimasukkan dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan hingga tanda batas menggunakan larutan *buffer* fosfat pH 7,3.

L.1.3.7.2. Pembuatan Larutan Urea 10^{-2} M

Untuk membuat 25 mL larutan urea 10^{-2} M, dipipet urea 10^{-1} M sebanyak

$$V \text{ urea } 10^{-1} \text{ M} = 10^{-2} \text{ M} / 10^{-1} \text{ M} \times 25 \text{ ml} = 2,5 \text{ mL}$$

Dipipet 2,5 mL larutan urea 10^{-1} M dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL dan diencerkan hingga tanda batas menggunakan larutan *buffer* fosfat pH 7,3. Volume urea konsentrasi lebih tinggi yang dipipet untuk membuat larutan urea dengan konsentrasi lebih rendah dan volume pengencerannya dengan *buffer* pH 7,3 disajikan pada Tabel L.1.

Tabel.L.1 Tabel Hubungan Antara Volume Urea Konsentrasi Tinggi yang Dipipet dan Volume Pengenceran hingga Didapatkan Konsentrasi Urea yang Lebih Rendah

[urea] yang dibuat (M)	[urea] yang di pipet (M)	V urea yang dipipet (ml)	V pengenceran dengan <i>buffer</i> pH 7,3 (ml)
10^{-3}	10^{-2}	2,5	25
10^{-4}	10^{-3}	2,5	25
10^{-5}	10^{-4}	2,5	25
10^{-6}	10^{-5}	2,5	25
10^{-7}	10^{-6}	2,5	25
10^{-8}	10^{-7}	2,5	25

L.1.3.8. Pembuatan Larutan Asam Asetat 0,8 %

Untuk membuat larutan asam asetat 0,8% sebanyak 100 ml, dipipet larutan asam asetat 2% sebanyak 40 ml, lalu dipindah ke labu takar 100 ml dan diencerkan hingga tanda batas dengan aquades.

L.1.3.9. Pembuatan NaOH 1 %

Untuk membuat larutan NaOH 1% sebanyak 100 ml, maka ditimbang NaOH sebanyak 1 gram lalu dilarutkan dalam gelas kimia 100 ml dengan aquades hingga tanda batas.

L.1.3.10 Pembuatan NaOH 10%

Untuk membuat larutan NaOH 10% sebanyak 50 ml, maka ditimbang NaOH sebanyak 5 gram lalu dilarutkan dalam gelas kimia 50 ml dengan aquades hingga tanda batas.

L.1.3.11. Pembuatan Asam Asetat 0,1 M

Untuk membuat larutan CH_3COOH 0,1 M sebanyak 100 mL, yang diperlukan adalah:

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

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

$$\text{Volume } \text{CH}_3\text{COOH} = 100 \text{ mL} \times 0,1/17,5 = 0,57 \text{ mL}$$

Diambil 0,57 mL larutan asam asetat glasial dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, kemudian diencerkan sampai tanda batas sehingga diperoleh larutan asam asetat 0,2 M.

L.1.3.12. Pembuatan Larutan Asam Asetat 0,1 M

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

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

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

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

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

$$10^{-4} \text{ M} = (1,75 \cdot 10^{-5})^{1/2} \times [\text{CH}_3\text{COOH}]$$

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

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

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

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

$$V \text{ CH}_3\text{COOH} = 0,57 \text{ mL}$$

Pembuatan larutan asam asetat 0,1 M pH 4,0 sebanyak 100 mL adalah dengan cara larutan asam asetat 0,1 M diambil sebanyak 0,57 mL dan dimasukkan dalam gelas kimia 250 mL dan ditambahkan akuades hingga 100 mL, kemudian diperiksa pH-nya dengan menggunakan pH meter.

L.1.3.14. 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.1.3.15. Larutan Baku Kasein 1000 ppm

Larutan kasein 1000 ppm dapat dibuat dengan cara ditimbang kasein sebanyak 0,1 g dan dimasukkan ke dalam gelas kimia 100

mL. Kemudian dilarutkan dengan 30 mL akuades dan ditambahkan beberapa tetes larutan NaOH 1 M. Setelah larut sempurna, diencerkan dengan akuades dan dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL secara kuantitatif dan ditambah akuades hingga tanda batas, dikocok sampai homogen sehingga diperoleh larutan kasein 1000 ppm.

L.1.4. Penentuan Kadar Protein

L.1.4.1. Kadar Protein Urease Murni

Penentuan kadar protein urease murni ditentukan dengan metode adisi standar, larutan blanko adalah 2 ml akuades, 8 ml reagen biuret dan 2 ml *buffer* fosfat pH8, sebagai larutan pembanding adalah 2 ml kasein 1000 ppm, 8 ml reagen biuret dan 2 ml *buffer* fosfat pH 8, kemudian kadar protein urease ditentukan dengan mengukur serapan larutan yang terdiri dari 2 ml urease, 2 ml kasein 1000 ppm, dan 8 ml reagen biuret dengan spektrofotometer UV-Vis. Hasil serapan larutan enzim dibandingkan dengan serapan larutan pembanding.

L.1.4.2 Kadar Protein Urease Teramobikan

Penentuan kadar protein urease teramobikan ditentukan dengan metode adisi standar, larutan blanko adalah 2 ml aquades, 8 ml reagen biuret dan 2 ml *buffer* fosfat pH8, sebagai larutan pembanding adalah 2 ml kasein 1000 ppm, 8 ml reagen biuret dan 2 ml *buffer* fosfat pH 8. Sisa dari 5ml urease yang digunakan untuk merendam membran diencerkan hingga 10 ml. Selanjutnya ditentukan kadar protein dari larutan yang terdiri dari 2 mL urease hasil pengenceran, 2 ml kasein 1000 ppm, dan 8 ml reagen biuret.

Lampiran 2. Penentuan Ketebalan Membran dan Kadar Protein

L.2.1. Penentuan Ketebalan Membran Kitosan

Masa kitosan (gram)	Pengukuran I (mm)	Pengukuran II (mm)	Pengukuran III (mm)	Rata-rata (mm)
0,10	0,21	0,21	0,21	0,21
0,15	0,31	0,31	0,31	0,31
0,20	0,36	0,36	0,36	0,36
0,25	0,43	0,43	0,43	0,43
0,30	0,46	0,46	0,46	0,46

L.2.2. Penentuan Kadar Protein Urease Fraksi 30-45%

Kasein 1000 ppm, λ maks=539,7 nm

Larutan yang ditentukan	A1	A2	A3	A rata-rata
Kasein 1000 ppm	0,0410	0,0412	0,0417	0,0413
Urease fraksi 30-45%	0,3314	0,3316	0,3309	0,3313

Perhitungan kadar protein urease fraksi 30-45%

$$\frac{A_{\text{kasein}}}{A_{\text{enzim murni}}} = \frac{\text{ppm kasein}}{\text{ppm kasein} + \text{ppm enzim (x)}}$$

$$\frac{0,0413}{0,3313} = \frac{1000}{1000 + X}$$

$$X = 7021,79 \text{ ppm}$$

L.2.3. Penentuan Kadar Protein Urease yang Teramobilkan

Tabel L.2.3 Absorbansi Larutan Urease Sisa Amobilisasi, Diukur pada λ maks = 539,7 nm

Ketebalan Membran	Absorbansi Urease Sisa Amobilisasi		
	A1	A2	A rata-rata
0,21 mm	0,1723	0,1723	0,1723
0,31 mm	0,1645	0,1644	0,1645
0,36 mm	0,1602	0,1600	0,1601
0,43 mm	0,1526	0,1526	0,1526
0,46 mm	0,1441	0,1442	0,1442

$$\frac{A \text{ kareim}}{A \text{ enzim}} = \frac{1000}{1000+X}$$

$$\frac{0,0413}{0,1723} = \frac{1000}{1000+X}$$

$$X = 3171,91 \text{ ppm}$$

Berdasarkan cara kerja pada L.1.4.2, kadar diatas adalah dalam 10 ml larutan, artinya dalam 5 ml larutan enzim kadar protein adalah

$$3171,9 \times 2 = 6343,82 \text{ ppm}$$

Protein urease yang teramobilisasi dalam membran kitosan 0,21 mm adalah

$$7021,79 \text{ ppm} - 6343,82 \text{ ppm} = 677,97 \text{ ppm}$$

$$\text{Masa enzim per 5 ml} = 5 \text{ ml} \times 1 \text{ L} / 1000 \text{ ml} \times 677,97 \text{ mg} / \text{L} = 3,39 \text{ mg}$$

$$V \text{ membran} = 22/7 \times (3,5/2 \text{ cm})^2 \times 0,021 \text{ cm} = 0,2021 \text{ cm}^3$$

$$\text{Konsentrasi enzim yang teramobilkan} = 3,39 \text{ mg} / 0,2021 \text{ cm}^3 = 16,77 \text{ mg} / \text{cm}^3$$

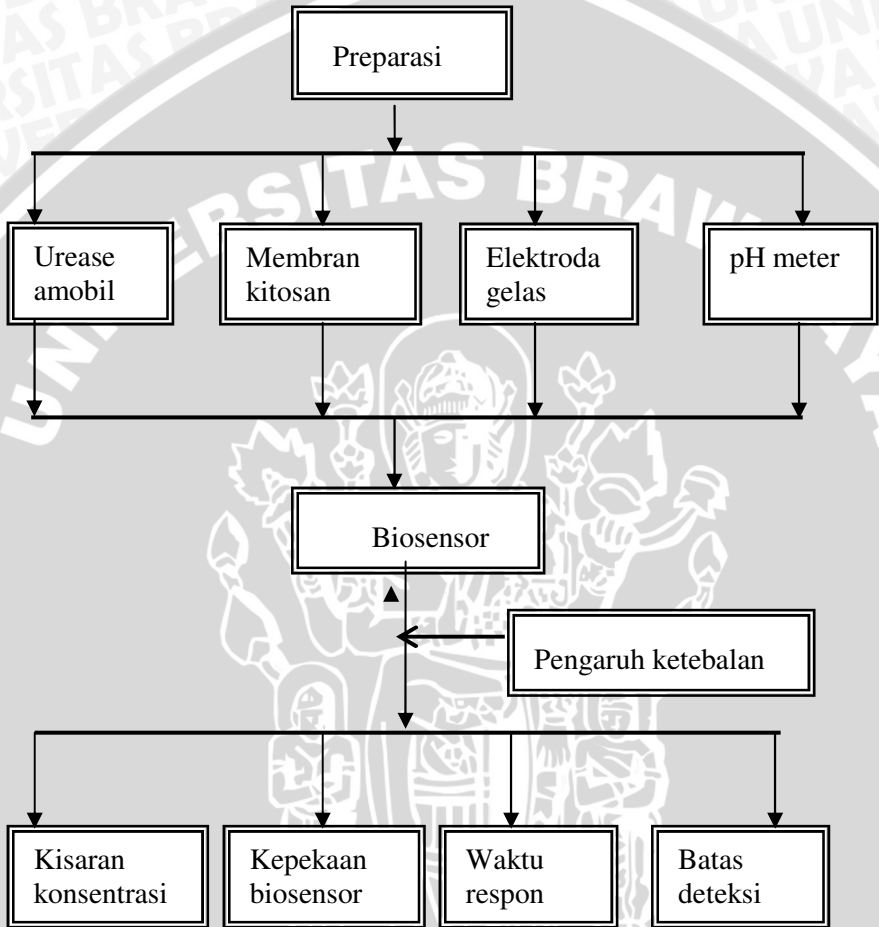
Dengan cara yang sama, kadar enzim pada tiap membran dapat ditentukan

Ketebalan membran (mm)	Masa enzim yang teramobilkan (mg)	Konsentrasi enzim yang teramobilkan (mg/ ml)	Konsentrasi enzim yang teramobilkan (mg/ cm ³)
0,21	3,39	0,678	16,774
0,31	5,29	1,058	17,714
0,36	6,30	1,260	18,167
0,43	8,15	1,630	19,686
0,46	10,21	2,042	23,064

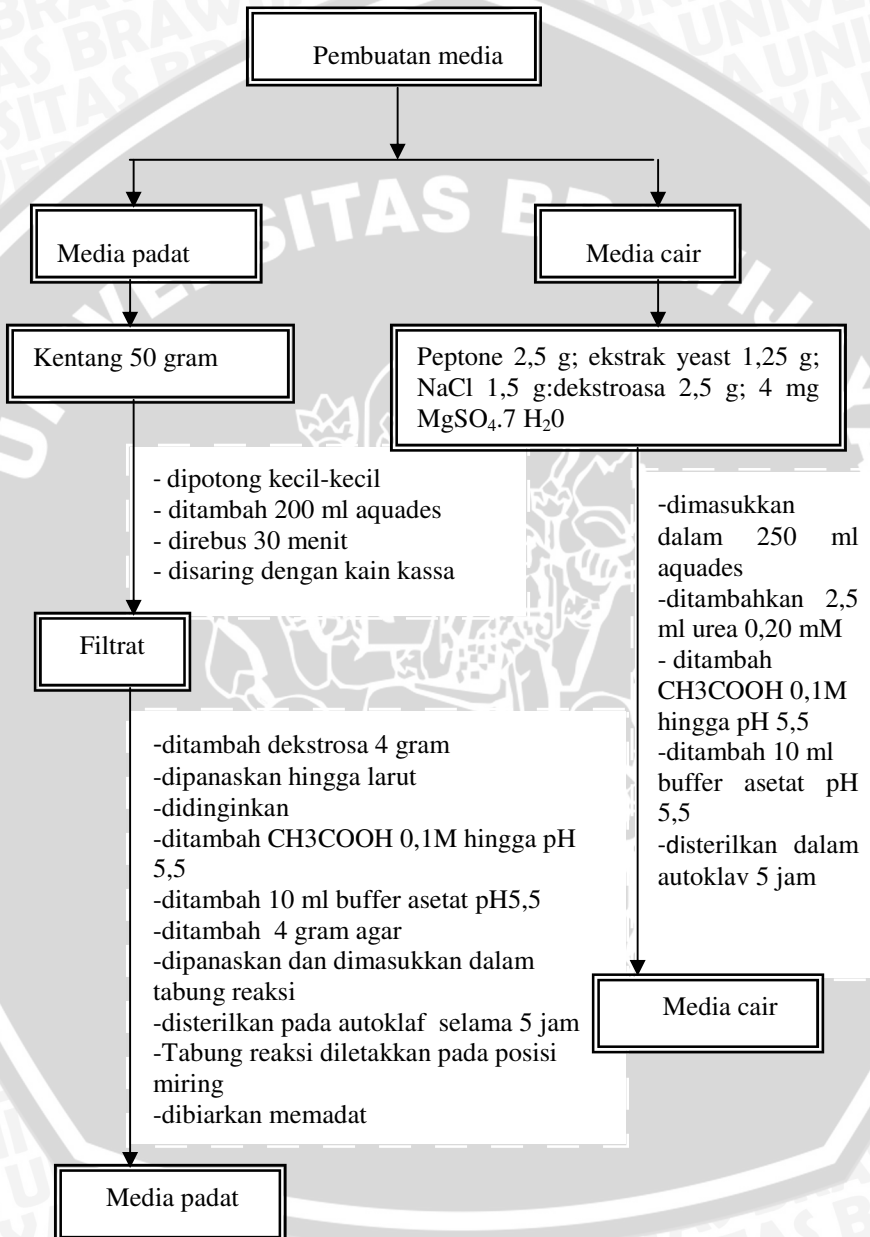


Lampiran 3. Diagram Kerja

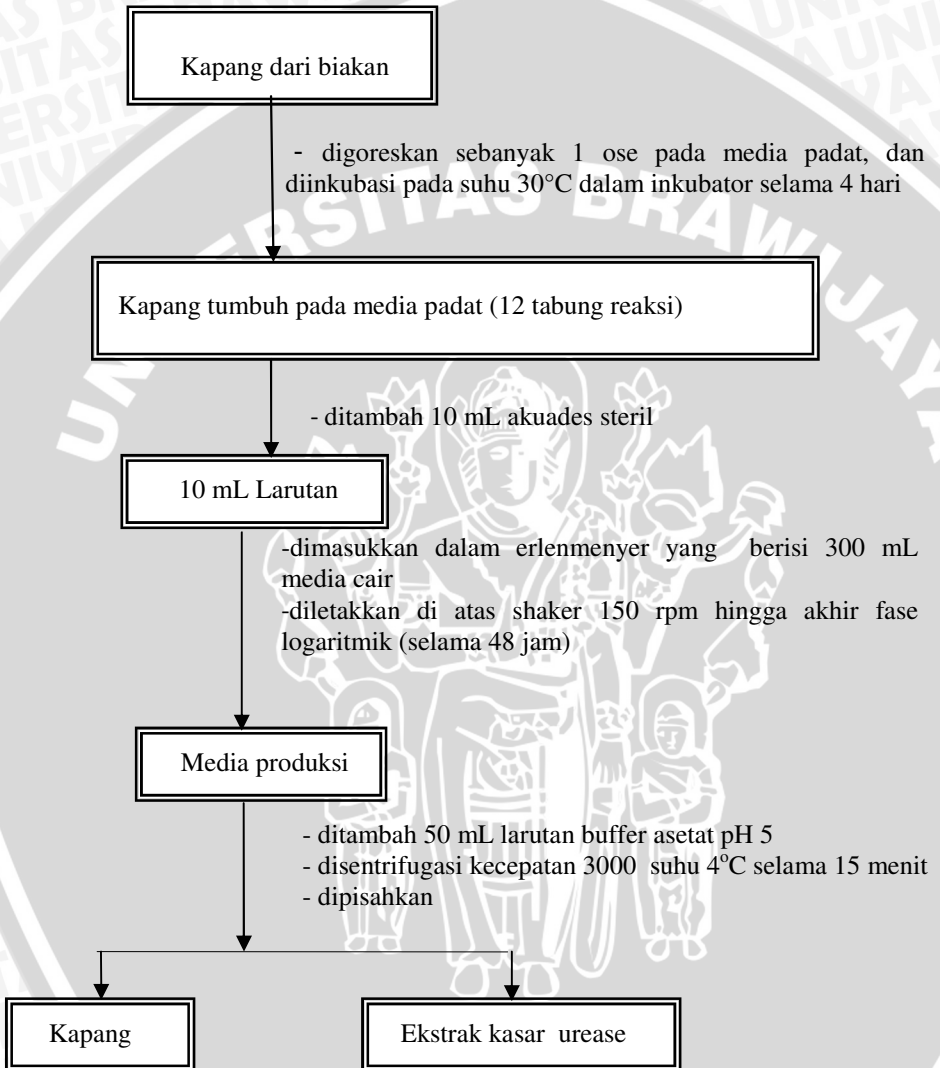
L.3.1. Diagram Alir Pembuatan Biosensor Urea



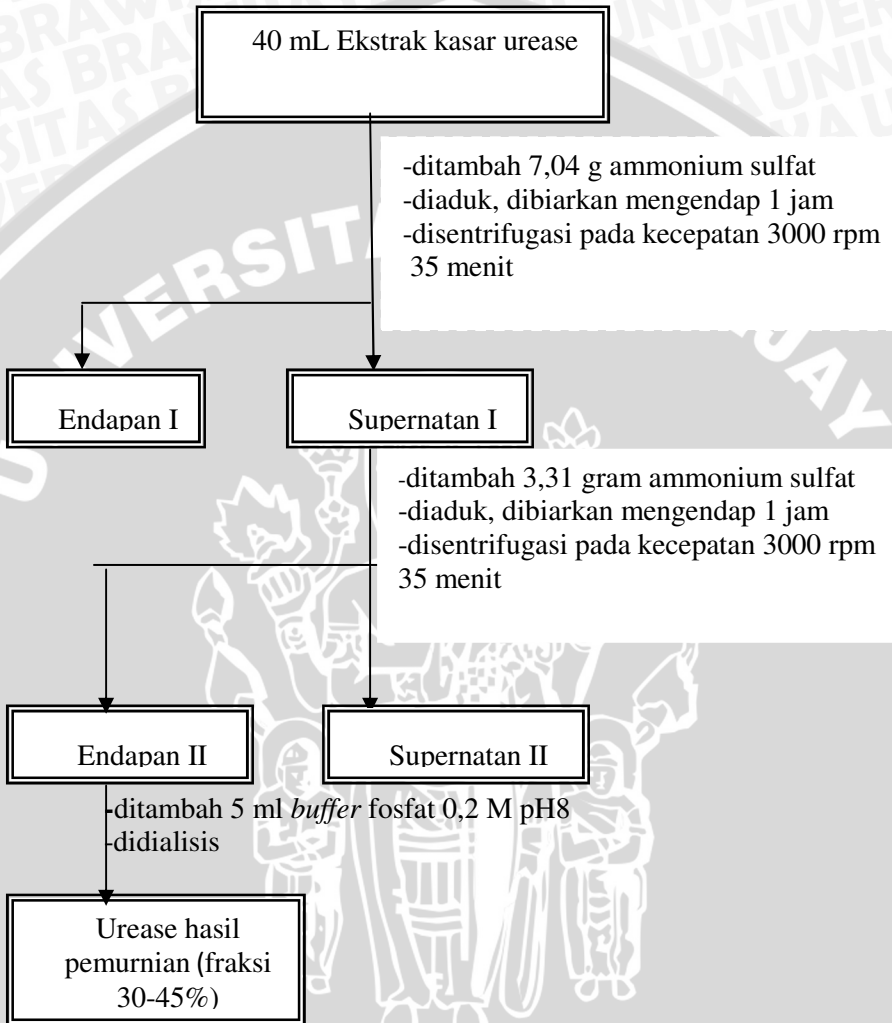
L.3.2. Pembuatan Media Pertumbuhan



L.3.3. Isolasi Ekstrak Enzim Urease dari *Schizosacharomyces pombe* 3054



L.3.4. Pemurnian Urease



L.3.5. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Kasein

2 ml kasein 1000 ppm, 8 ml reagen biuret dan 2 ml buffer fosfat pH8

- dikocok, dan di diamkan 1 jam
- diukur absorbansi pada daerah 200 hingga 600 nm
- dibuat hubungan absorbansi dan panjang gelombang
- ditentukan λ Maks

λ Maks kasein

L.3.6. Penentuan Kadar Protein

2 ml urease, 2 ml kasein 1000 ppm, dan 8 ml reagen biuret

- diukur serapannya pada λ Maks
- dilakukan duplo

Data

L.3.7. Pembuatan Membran Kitosan

Kitosan dengan masa
0,1;0,15;0,2;0,25; dan 0,3 gram

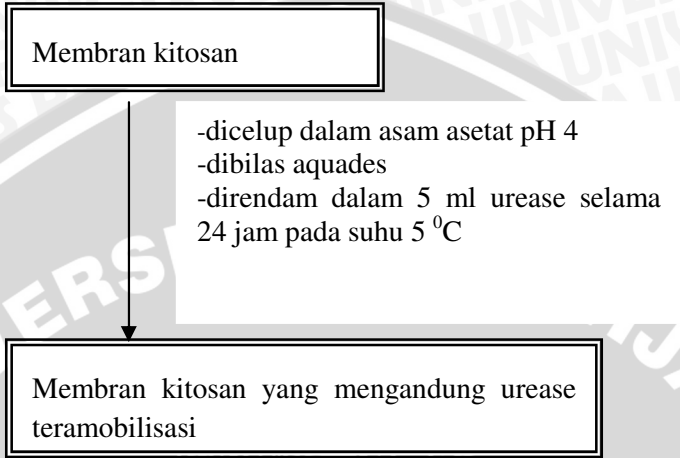
- dilarutkan dalam 10 ml CH_3COOH 0,8 %
- diaduk dengan stirrer selama 24 jam
- ditambah satu tetes glutaraldehid 1%
- dihomogenkan selama 2 jam

Larutan kitosan

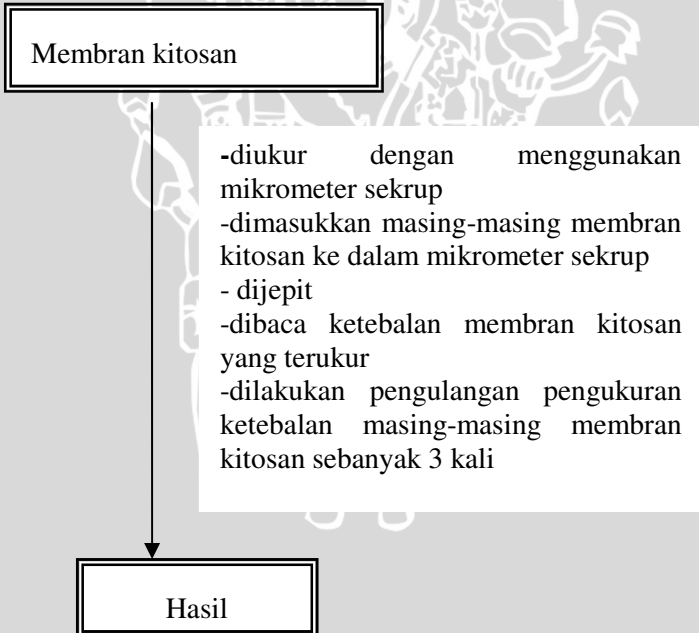
- dituang di atas plat kaca datar 10 x 20 cm yang bagian tepinya sudah diberi isolasi
- dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C
- didinginkan, dicetak dengan diameter 3,5 cm
- dicelup pada larutan NaOH 1 % selama 30 menit
- dibilas dengan aquades
- dihomogenkan selama 2 jam

Membran kitosan

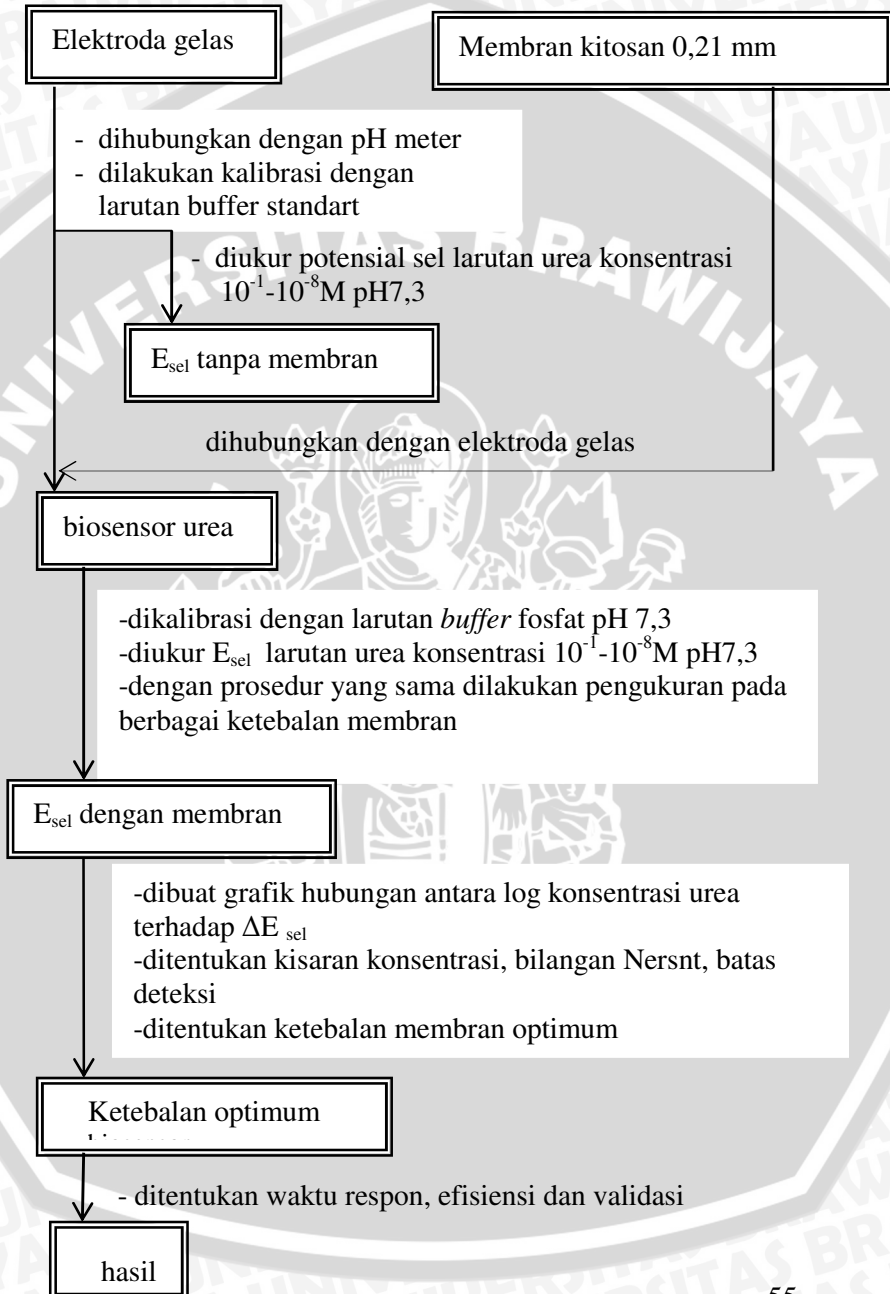
L.3.8. Amobilisasi Urease



L.3.9. Pengukuran Ketebalan Membran



L.3.10. Karakteristik Biosensor Urea



Lampiran 4. Data Potensial Sel

L.4.1. Data E_{sel} Berbagai Konsentrasi Urea (10^{-8} - 10^{-1} M), Hasil Pengukuran dengan Elektroda Gelas dan Biosensor Urea pada pH=7,3, T=27°C, t=6menit, Ketebalan Membran Kitosan 0,21 mm

[Urea]	log [urea]	Pengukuran 1		Pengukuran 2	
		A	B	A	B
Blanko		-38	-38	-36	-34
10^{-1}	-1	-38	-20	-36	-8
10^{-2}	-2	-38	+14	-36	+10
10^{-3}	-3	-38	+16	-36	+19
10^{-4}	-4	-38	+18	-36	+23
10^{-5}	-5	-38	-8	-36	-6
10^{-6}	-6	-38	-39	-36	-33
10^{-7}	-7	-38	-30	-36	-28
10^{-8}	-8	-38	-30	-36	-29

[Urea]	log [urea]	Pengukuran 3		Pengukuran 4	
		A	B	A	B
Blanko		-40	-36	-33	-31
10^{-1}	-1	-40	-12	-33	-14
10^{-2}	-2	-40	+8	-33	+10
10^{-3}	-3	-40	+13	-33	+9
10^{-4}	-4	-40	+18	-33	+22
10^{-5}	-5	-40	-12	-33	-4
10^{-6}	-6	-40	-36	-33	-32
10^{-7}	-7	-40	-38	-33	-26
10^{-8}	-8	-40	-36	-33	-27

[Urea] (M)	log [urea]	Pengukuran 5		Pengukuran 6	
		A	B	A	B
Blanko		-34	-34	-34	-34
10^{-1}	-1	-36	-12	-32	+16
10^{-2}	-2	-36	+12	-32	-6
10^{-3}	-3	-36	+14	-32	-12
10^{-4}	-4	-35	+21	-32	+11
10^{-5}	-5	-35	-9	-32	+11
10^{-6}	-6	-35	-36	-32	-19
10^{-7}	-7	-35	-26	-33	-11
10^{-8}	-8	-35	-26	-33	-15

Keterangan: A= E_{sel} hasil pengukuran dengan elektroda gelas (mV)
 B= E_{sel} hasil pengukuran dengan biosensor urea (mV)

L.4.2. Data ΔE_{sel} Berbagai Konsentrasi Urea (10^{-8} - 10^{-1} M), pada Ketebalan Membran Kitosan 0,21 mm (Sebelum Uji Q)
 $\Delta E_{sel} = B - A$ (mV)

[Urea] (M)	ΔE_{sel} 1	ΔE_{sel} 2	ΔE_{sel} 3	ΔE_{sel} 4	ΔE_{sel} 5	ΔE_{sel} 6
Blanko	0	2	4	2	0	0
10^{-1}	18	28	28	19	24	48
10^{-2}	52	46	48	43	48	26
10^{-3}	54	55	53	42	50	20
10^{-4}	56	59	58	55	56	43
10^{-5}	30	30	28	29	26	43
10^{-6}	1	3	4	1	1	13
10^{-7}	8	8	2	7	9	22
10^{-8}	8	7	4	6	9	18

Uji Q terhadap ΔE_{sel} dari 6 pengukuran yang dilakukan. Jika $Q_{hitung} > Q_{95\%}$, maka data ΔE_{sel} dibuang. $Q_{95\%} = 0,625$

$$Q \text{ hitung} = \frac{[\text{data terbesar atau terkecil} - \text{data terdekat}]}{\text{data terbesar} - \text{data terkecil}}$$

Untuk konsentrasi 10^{-1} M, Urutan ΔE_{sel} adalah :
18, 19, 24, 28, 28, 48

$$1. \quad Q \text{ hitung} = \frac{[18-18]}{48-18} = \frac{1}{30} = 0,033$$

Q hitung < 0,625, jadi data terkecil, yaitu 18 tidak dibuang

$$2. \quad Q \text{ hitung} = \frac{[48-28]}{48-18} = \frac{20}{30} = 0,667$$

Q hitung > 0,625, jadi data terbesar, yaitu 48 harus dibuang

Data ΔE_{sel} yang digunakan adalah 18, 19, 24, 28, 28

Dengan cara yang sama dilakukan uji Q terhadap ΔE_{sel} larutan urea 10^{-2} M – 10^{-8} M

L.4.3. Tabel Q Hitung Data ΔE_{sel} Berbagai Konsentrasi Urea (10^{-8} - 10^{-1} M), pada Ketebalan Membran Kitosan 0,21 mm

[urea](M)	Q hitung data terkecil	Q hitung data terbesar
10^{-2}	0,653	0,154
10^{-3}	0,629	0,003
10^{-4}	0,750	0,028
10^{-5}	0,118	0,765
10^{-6}	0,000	0,750
10^{-7}	0,250	0,650
10^{-8}	0,143	0,642

Dari data Q hitung di atas, data yang memiliki Q hitung > 0,625 dibuang, sedangkan yang nilai Q hitungnya < 0,625 tetap digunakan. Data ΔE_{sel} yang digunakan untuk menentukan ΔE_{sel} rata-rata disajikan pada tabel L.4.4.

L.4.4. Data ΔE_{sel} Berbagai Konsentrasi Urea (10^{-8} - 10^{-1} M), Ketebalan Membran= 0,21 mm (Data yang Lolos Uji Q)

[Urea] (M)	ΔE_{sel} 1	ΔE_{sel} 2	ΔE_{sel} 3	ΔE_{sel} 4	ΔE_{sel} 5	ΔE_{sel} rata-rata
Blanko	0	2	4	2	0	1,6
10^{-1}	18	28	28	19	24	23,4
10^{-2}	52	46	48	43	48	47,4
10^{-3}	54	55	53	42	50	50,8
10^{-4}	56	59	58	55	56	56,8
10^{-5}	30	30	28	29	26	28,6
10^{-6}	1	3	4	1	1	2,0
10^{-7}	8	8	2	7	9	6,8
10^{-8}	8	7	4	6	9	6,8

Standar Deviasi: 0,418

L.4.5. Data E_{sel} Berbagai Konsentrasi Urea (10^{-8} - 10^{-1} M), Hasil Pengukuran dengan Elektroda Gelas dan Biosensor Urea pada pH=7,3,T=27°C, t=6menit, Ketebalan Membran KITOSAN 0,31 mm

[Urea]	log [urea]	Pengukuran 1		Pengukuran 2	
		A	B	A	B
Blanko		-34	-34	-34	-35
10^{-1}	-1	-32	-13	-36	-7
10^{-2}	-2	-32	-13	-36	-9
10^{-3}	-3	-32	+22	-36	+15
10^{-4}	-4	-32	-3	-35	-5
10^{-5}	-5	-32	-25	-35	-29
10^{-6}	-6	-32	-18	-35	-21
10^{-7}	-7	-33	-18	-35	-24
10^{-8}	-8	-33	-19	-35	-22

[Urea]	log [urea]	Pengukuran 3		Pengukuran 4	
		A	B	A	B
Blanko		-38	-38	-36	-34
10^{-1}	-1	-38	-7	-36	-12
10^{-2}	-2	-38	-2	-36	-4
10^{-3}	-3	-38	+15	-36	+19
10^{-4}	-4	-38	-9	-36	-14
10^{-5}	-5	-38	-29	-36	-32
10^{-6}	-6	-38	-29	-36	-32
10^{-7}	-7	-38	-27	-36	-34
10^{-8}	-8	-38	-28	-36	-33

Pengukuran 5	
A	B
-40	-39
-40	-13
-40	-10
-40	+16
-40	-15
-40	-35
-40	-36
-40	-37
-40	-39

Keterangan: A= E_{sel} hasil pengukuran dengan elektroda gelas (mV)
 B= E_{sel} hasil pengukuran dengan biosensor urea (mV)

L.4.6. Data ΔE_{sel} Berbagai Konsentrasi Urea (10^{-8} - 10^{-1} M), Ketebalan Membran= 0,31 mm (Sebelum Uji Q)
 $\Delta E_{sel} = B - A$ (mV)

[Urea] (M)	ΔE_{sel} 1	ΔE_{sel} 2	ΔE_{sel} 3	ΔE_{sel} 4	ΔE_{sel} 5
Blanko	0	1	0	2	1
10^{-1}	19	29	31	28	27
10^{-2}	19	27	36	32	30
10^{-3}	54	51	53	55	56
10^{-4}	29	30	29	22	25
10^{-5}	7	6	9	4	5
10^{-6}	14	14	9	4	4
10^{-7}	15	11	11	2	3
10^{-8}	14	13	10	3	1

Uji Q terhadap ΔE_{sel} dari 5 pengukuran yang dilakukan. Jika Qhitung $> Q_{95\%}$, maka data ΔE_{sel} dibuang. $Q_{95\%} = 0,710$

L.4.7. Tabel Q Hitung Data ΔE_{sel} Berbagai Konsentrasi Urea (10^{-8} - 10^{-1} M), pada Ketebalan Membran Kitosan 0,31 mm

[urea](M)	Q hitung data terkecil	Q hitung data terbesar
10^{-1}	0,667	0,167
10^{-2}	0,470	0,235
10^{-3}	0,400	0,200
10^{-4}	0,375	0,125
10^{-5}	0,200	0,400
10^{-6}	0,000	0,000
10^{-7}	0,077	0,308
10^{-8}	0,154	0,154

Pada Tabel L.4.7, dapat dilihat bahwa semua Qhitung $< 0,710$, jadi semua data digunakan.

L.4.8. Data ΔE_{sel} Berbagai Konsentrasi Urea (10^{-8} - 10^{-1} M), Ketebalan Membran= 0,31 mm (Data yang Lolos Uji Q)

[Urea] (M)	ΔE_{sel} 1	ΔE_{sel} 2	ΔE_{sel} 3	ΔE_{sel} 4	ΔE_{sel} 5	ΔE_{sel} rata-rata
Blanko	0	1	0	2	0	0,8
10^{-1}	19	29	31	28	19	26,8
10^{-2}	19	27	36	32	19	28,8
10^{-3}	54	51	53	55	54	53,8
10^{-4}	29	30	29	22	29	27,0
10^{-5}	7	6	9	4	7	6,2
10^{-6}	14	14	9	4	14	9,0
10^{-7}	15	11	11	2	15	8,4
10^{-8}	14	13	10	3	14	8,2

Standar Deviasi: 1,643

L.4.9. Data E_{sel} Berbagai Konsentrasi Urea (10^{-8} - 10^{-1} M), Hasil Pengukuran dengan Elektroda Gelas dan Biosensor Urea pada pH=7,3,T=27°C, t=6menit, Ketebalan Membran KITOSAN 0,36 mm

[Urea]	log [urea]	Pengukuran 1		Pengukuran 2	
		A	B	A	B
Blanko		-34	-34	-34	-39
10^{-1}	-1	-32	+6	-36	-8
10^{-2}	-2	-32	+14	-36	+9
10^{-3}	-3	-32	+14	-36	+14
10^{-4}	-4	-32	+16	-35	+13
10^{-5}	-5	-32	-10	-35	-15
10^{-6}	-6	-32	-28	-35	-36
10^{-7}	-7	-33	-28	-35	-37
10^{-8}	-8	-33	-29	-35	-37

[Urea]	log [urea]	Pengukuran 3		Pengukuran 4	
		A	B	A	B
Blanko		-38	-38	-36	-32
10^{-1}	-1	-38	-14	-36	-12
10^{-2}	-2	-38	-11	-36	-9
10^{-3}	-3	-38	0	-36	+4
10^{-4}	-4	-38	+10	-36	+14
10^{-5}	-5	-38	-17	-36	-12
10^{-6}	-6	-38	-33	-36	-33
10^{-7}	-7	-38	-34	-36	-35
10^{-8}	-8	-38	-36	-36	-36

[Urea]	log [urea]	Pengukuran 5		Pengukuran 6	
		A	B	A	B
Blanko		-32	-30	-34	-32
10^{-1}	-1	-32	-30	-34	-32
10^{-2}	-2	-32	-30	-34	-32
10^{-3}	-3	-32	-30	-34	-32
10^{-4}	-4	-32	-30	-34	-32
10^{-5}	-5	-32	-30	-34	-32
10^{-6}	-6	-32	-30	-34	-32
10^{-7}	-7	-32	-30	-34	-32
10^{-8}	-8	-32	-30	-34	-32

Pengukuran 7	
A	B
-40	-38
-40	-12
-40	-9
-40	+2
-40	+16
-40	-10
-40	-34
-40	-36
-40	-38

Keterangan: A= E_{sel} hasil pengukuran dengan elektroda gelas (mV)
 B= E_{sel} hasil pengukuran dengan biosensor urea (mV)

L.4.10. Data ΔE_{sel} Berbagai Konsentrasi Urea (10^{-8} - 10^{-1} M), Ketebalan Membran= 0,36 mm (Sebelum Uji Q)
 $\Delta E_{sel} = B - A$ (mV)

[Urea] (M)	ΔE_{sel} 1	ΔE_{sel} 2	ΔE_{sel} 3	ΔE_{sel} 4	ΔE_{sel} 5	ΔE_{sel} 6	ΔE_{sel} 7
Blanko	0	5	0	4	2	2	2
10^{-1}	38	28	24	24	2	2	28
10^{-2}	46	45	27	27	2	2	31
10^{-3}	46	50	38	40	2	2	42
10^{-4}	48	48	48	50	2	2	56
10^{-5}	22	20	21	24	2	2	30
10^{-6}	4	1	5	3	2	2	6
10^{-7}	5	2	4	1	2	2	4
10^{-8}	4	2	2	0	2	2	2

Uji Q terhadap ΔE_{sel} dari 7 pengukuran yang dilakukan. Jika Qhitung $> Q_{95\%}$, maka data ΔE_{sel} dibuang. $Q_{95\%} = 0,568$

L.4.11. Tabel Q Hitung Data ΔE_{sel} Berbagai Konsentrasi Urea (10^{-8} - 10^{-1} M), pada Ketebalan Membran Kitosan 0,36 mm

[urea](M)	Q hitung data terkecil	Q hitung data terbesar
10^{-1}	0,611	0,278
10^{-2}	0,569	0,023
10^{-3}	0,750	0,083
10^{-4}	0,852	0,111
10^{-5}	0,643	0,214
10^{-6}	0,200	0,200
10^{-7}	0,250	0,250
10^{-8}	0,500	0,500

Dari data Q hitung di atas, data yang memiliki Q hitung $> 0,568$ dibuang, sedangkan yang nilai Qhitungnya $< 0,568$ tetap digunakan. Data ΔE_{sel} yang digunakan untuk menentukan ΔE_{sel} rata-rata disajikan pada tabel L.4.12.

L.4.12. Data ΔE_{sel} Berbagai Konsentrasi Urea (10^{-8} - 10^{-1} M), Ketebalan Membran= 0,36 mm (Data yang Lolos Uji Q)

[Urea] (M)	ΔE_{sel} 1	ΔE_{sel} 2	ΔE_{sel} 3	ΔE_{sel} 4	ΔE_{sel} 5	ΔE_{sel} rata-rata
Blanko	0	5	0	4	2	2,2
10^{-1}	38	28	24	24	28	28,4
10^{-2}	46	45	27	27	31	35,2
10^{-3}	46	50	38	40	42	43,2
10^{-4}	48	48	48	50	56	50,0
10^{-5}	22	20	21	24	30	23,4
10^{-6}	4	2	5	3	6	3,8
10^{-7}	5	2	4	2	4	3,2
10^{-8}	4	2	2	0	2	2,0

Standar Deviasi: 1,387

L.4.13. Data E_{sel} Berbagai Konsentrasi Urea (10^{-8} - 10^{-1} M), Hasil Pengukuran dengan Elektroda Gelas dan Biosensor Urea pada pH=7,3,T=27°C, t=6menit, Ketebalan Membran KITOSAN 0,43 mm

[Urea]	log [urea]	Pengukuran 1		Pengukuran 2	
		A	B	A	B
Blanko		-34	-34	-38	-35
10^{-1}	-1	-32	+12	-38	-2
10^{-2}	-2	-32	+11	-38	0
10^{-3}	-3	-32	+10	-38	+8
10^{-4}	-4	-32	+7	-38	+9
10^{-5}	-5	-32	-7	-38	-18
10^{-6}	-6	-32	-27	-38	-31
10^{-7}	-7	-33	-28	-38	-39
10^{-8}	-8	-33	-28	-38	-37

[Urea]	log [urea]	Pengukuran 3		Pengukuran 4	
		A	B	A	B
Blanko		-36	-34	-37	-35
10^{-1}	-1	-36	-2	-37	-11
10^{-2}	-2	-36	-4	-37	-1
10^{-3}	-3	-36	+6	-37	+1
10^{-4}	-4	-36	+14	-37	+9
10^{-5}	-5	-36	-15	-37	-19
10^{-6}	-6	-36	-30	-38	-34
10^{-7}	-7	-36	-35	-38	-35
10^{-8}	-8	-36	-34	-38	-35

Pengukuran 5	
A	B
-40	-39
-40	-14
-40	-8
-40	+6
-40	+11
-40	-21
-40	-36
-40	-36
-40	-37

Keterangan: A= E_{sel} hasil pengukuran dengan elektroda gelas (mV)
 B= E_{sel} hasil pengukuran dengan biosensor urea (mV)

L.4.14. Data ΔE_{sel} Berbagai Konsentrasi Urea (10^{-8} - 10^{-1} M), Ketebalan Membran= 0,43 mm (Sebelum Uji Q)
 $\Delta E_{sel} = B - A$ (mV)

[Urea] (M)	ΔE_{sel} 1	ΔE_{sel} 2	ΔE_{sel} 3	ΔE_{sel} 4	ΔE_{sel} 5
Blanko	0	3	2	2	1
10^{-1}	44	36	34	26	26
10^{-2}	43	38	32	36	32
10^{-3}	42	46	42	38	46
10^{-4}	39	47	50	46	51
10^{-5}	25	20	21	18	19
10^{-6}	5	7	6	4	4
10^{-7}	5	1	1	3	4
10^{-8}	3	3	2	2	2

Uji Q terhadap ΔE_{sel} dari 5 pengukuran yang dilakukan. Jika Qhitung $> Q_{95\%}$, maka data ΔE_{sel} dibuang. $Q_{95\%} = 0,710$

L.4.15. Tabel Q Hitung Data ΔE_{sel} Berbagai Konsentrasi Urea (10^{-8} - 10^{-1} M), pada Ketebalan Membran Kitosan 0,43 mm

[urea](M)	Q hitung data terkecil	Q hitung data terbesar
10^{-1}	0,444	0,444
10^{-2}	0,364	0,455
10^{-3}	0,500	0,500
10^{-4}	0,583	0,083
10^{-5}	0,143	0,571
10^{-6}	0,333	0,333
10^{-7}	0,250	0,250
10^{-8}	0,333	0,333

Pada Tabel L.4.15, dapat dilihat bahwa semua Qhitung $< 0,710$, jadi semua data digunakan.

**L.4.16. Data ΔE_{sel} Berbagai Konsentrasi Urea (10^{-8} - 10^{-1} M),
Ketebalan Membran= 0,43 mm (Data yang Lolos Uji Q)**

[Urea] (M)	ΔE_{sel} 1	ΔE_{sel} 2	ΔE_{sel} 3	ΔE_{sel} 4	ΔE_{sel} 5	ΔE_{sel} rata-rata
Blanko	0	3	2	2	1	1,6
10^{-1}	44	36	34	26	26	33,2
10^{-2}	43	38	32	36	32	36,2
10^{-3}	42	46	42	38	46	42,8
10^{-4}	39	47	50	46	51	46,6
10^{-5}	25	20	21	18	19	20,6
10^{-6}	5	7	6	4	4	5,2
10^{-7}	5	1	1	3	4	2,8
10^{-8}	3	3	2	2	2	2,4

Standar Deviasi : 2,564

**L.4.17. Data E_{sel} Berbagai Konsentrasi Urea (10^{-8} - 10^{-1} M), Hasil
Pengukuran dengan Elektroda Gelas dan Biosensor Urea
pada pH=7,3,T=27°C, t=6menit, Ketebalan Membran
Kitosan 0,46 mm**

[Urea]	log [urea]	Pengukuran 1		Pengukuran 2	
		A	B	A	B
Blanko		-34	-29	-38	-31
10^{-1}	-1	-36	-21	-38	-29
10^{-2}	-2	-36	-24	-38	-19
10^{-3}	-3	-36	-21	-38	0
10^{-4}	-4	-35	-24	-38	-8
10^{-5}	-5	-35	-26	-38	-15
10^{-6}	-6	-35	-30	-38	-23
10^{-7}	-7	-35	-29	-38	-25
10^{-8}	-8	-35	-29	-38	-29

Pengukuran 3	
A	B
-36	-36
-36	-30
-36	-21
-36	-12
-36	-17
-36	-22
-36	-27
-36	-31
-36	-36

Keterangan: A= E_{sel} hasil pengukuran dengan elektroda gelas (mV)
 B= E_{sel} hasil pengukuran dengan biosensor urea (mV)

**L.4.18. Data ΔE_{sel} Berbagai Konsentrasi Urea (10^{-8} - 10^{-1} M),
 Ketebalan Membran= 0,46 mm (Sebelum Uji Q)
 $\Delta E_{sel} = B - A$ (mV)**

[Urea] (M)	$\Delta E_{sel} 1$	$\Delta E_{sel} 2$	$\Delta E_{sel} 3$
Blanko	5	7	0
10^{-1}	15	9	6
10^{-2}	12	19	15
10^{-3}	15	38	24
10^{-4}	11	30	19
10^{-5}	9	23	14
10^{-6}	5	15	9
10^{-7}	6	13	5
10^{-8}	6	9	0

Uji Q terhadap ΔE_{sel} dari 3 pengukuran yang dilakukan. Jika Qhitung > $Q_{95\%}$, maka data ΔE_{sel} dibuang. $Q_{95\%} = 0,970$

L.4.19. Tabel Q Hitung Data ΔE_{sel} Berbagai Konsentrasi Urea (10^{-8} - 10^{-1} M), pada Ketebalan Membran Kitosan 0,46 mm

[urea](M)	Q hitung data terkecil	Q hitung data terbesar
10^{-1}	0,333	0,667
10^{-2}	0,429	0,571
10^{-3}	0,391	0,609
10^{-4}	0,421	0,579
10^{-5}	0,357	0,643
10^{-6}	0,400	0,600
10^{-7}	0,125	0,875
10^{-8}	0,667	0,333

Pada Tabel L.4.19, dapat dilihat bahwa semua Qhitung < 0,970, jadi semua data digunakan.

L.4.20. Data ΔE_{sel} Berbagai Konsentrasi Urea (10^{-8} - 10^{-1} M), Ketebalan Membran= 0,46 mm (Data yang Lolos uji Q)

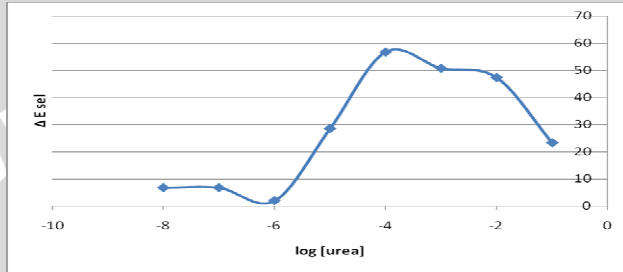
[Urea] (M)	$\Delta E_{sel} 1$	$\Delta E_{sel} 2$	$\Delta E_{sel} 3$	ΔE_{sel} rata-rata
Blanko	5	7	0	4,00
10^{-1}	15	9	6	10,00
10^{-2}	12	19	15	15,33
10^{-3}	15	38	24	25,67
10^{-4}	11	30	19	20,00
10^{-5}	9	23	14	15,33
10^{-6}	5	15	9	9,67
10^{-7}	6	13	5	8,00
10^{-8}	6	9	0	5,00

Standar Deviasi : 2,082

Lampiran 5. Penentuan Parameter Kinerja Biosensor

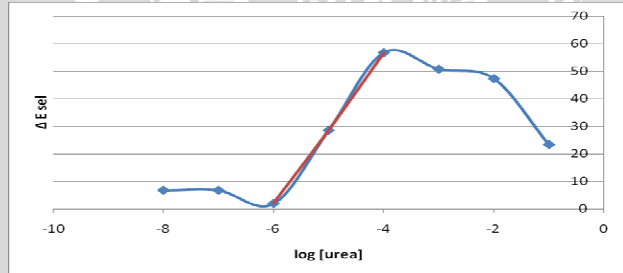
Parameter kinerja biosensor potensiometri urea yang meliputi bilangan Nernst, kisaran konsentrasi, dan batas deteksi ditentukan dari grafik hubungan antara $\log [\text{urea}]$ dengan ΔE_{sel} .

Contoh: Penentuan parameter kinerja biosensor potensiometri urea dengan ketebalan membran 0,21 mm pada pH 7,3



Gambar L.5.1 Kurva Hubungan antara Log [urea] dengan ΔE_{sel} pada Ketebalan Membran Kitosan 0,21 mm

Penentuan kisaran konsentrasi

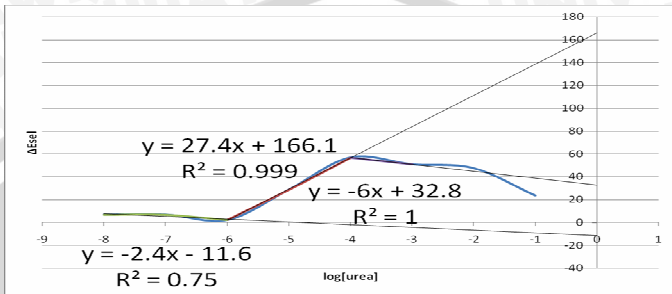


Gambar L.5.2 Kurva Penentuan Kisaran Konsentrasi Biosensor Potensiometri Urea pada Ketebalan Membran Kitosan 0,21 mm

Kisaran Konsentrasi = $10^{-6}\text{M}-10^{-4}\text{M}$

Kisaran konsentrasi ditentukan pada daerah linier kurva hubungan antara antara $\log [\text{urea}]$ dengan ΔE_{sel} . Gambar L.5.2 menunjukkan kisaran konsentrasi biosensor potensiometri dengan ketebalan membran kitosan 0,21 mm adalah $10^{-6}-10^{-4}\text{M}$.

Penentuan batas deteksi



Gambar L.5.3 Kurva Penentuan Batas Deteksi Biosensor Potensiometri Urea dengan Ketebalan Membran Kitosan 0,21 mm

Batas deteksi biosensor urea ditentukan dari perpotongan garis dua garis sesuai gambar L.6.4.

$$27,4x + 166,1 = -2,4x - 11,6$$

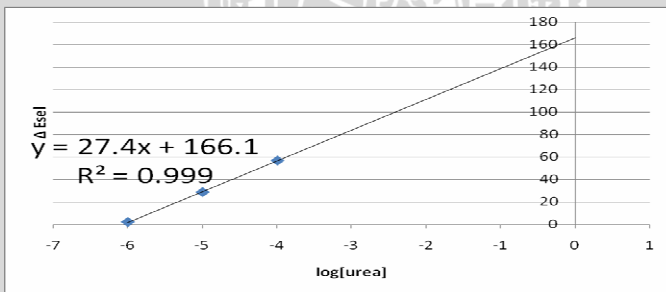
$$x = -5,963$$

$$\log [\text{urea}] = -5,963$$

$$[\text{urea}] = 1,088 \times 10^{-6} \text{ M}$$

$$\text{Batas Deteksi} = 1,088 \times 10^{-6} \text{ M}$$

Penentuan bilangan Nersnt



Gambar L.5.4 Kurva Penentuan Bilangan Nersnt pada Biosensor Potensiometri Urea dengan Ketebalan Membran Kitosan 0,21 mm
Bilangan Nernst = 27,4 mV/dekade

Lampiran 6. Penentuan Efisiensi Biosensor

Tabel L.6 Data E_{sel} dengan Ketebalan Membran 0,21 mm, Konsentrasi Urea yang Diukur 0-10 ppm pada pH=7,3; T=27°C; t=6menit

Pengukuran I Esel

[urea]	A	B	ΔE_{sel} 1	A	B	ΔE_{sel} 2	Rata-rata ΔE_{sel}
0	-37	-37	0	-40	-39	1	0,5
0,01	-37	-35	2	-40	-39	1	1,5
0,06	-37	-32	5	-40	-37	3	4,0
0,1	-37	-30	7	-40	-35	5	6,0
0,6	-37	-9	28	-39	-11	28	28,0
1	-37	-4	33	-39	-4	35	34,0
6	-37	+22	59	-39	+20	59	59,0
10	-37	+15	52	-39	+11	50	51,0

Pengukuran II Esel

[urea]	A	B	ΔE_{sel} 1	A	B	ΔE_{sel} 2	Rata-rata ΔE_{sel}
0	-37	-36	1	-40	-39	1	1,0
0,01	-37	-35	2	-40	-38	2	2,0
0,06	-37	-34	3	-40	-38	2	2,5
0,1	-37	-32	5	-40	-35	5	5,0
0,6	-37	-10	27	-39	-9	30	28,5
1	-37	-6	31	-39	-6	33	32,0
6	-37	+22	59	-39	+20	59	59,0
10	-37	+18	55	-39	+9	48	51,5

Pengukuran III Esel

[urea]	A	B	ΔE_{sel} 1	A	B	ΔE_{sel} 2	Rata-rata ΔE_{sel}
0	-37	-35	2	-40	-39	1	1,5
0,01	-37	-35	2	-40	-38	2	2,0
0,06	-37	-34	3	-40	-37	3	3,0
0,1	-37	-32	5	-40	-33	7	6,0
0,6	-37	-9	28	-39	-10	29	29,5
1	-37	-4	33	-39	-4	35	34,0
6	-37	+22	59	-39	+18	57	58,0
10	-37	+10	47	-39	+7	46	46,5

Pengukuran IV Esel

[urea]	A	B	ΔE_{sel} 1	A	B	ΔE_{sel} 2	Rata-rata ΔE_{sel}
0	-37	-37	0	-40	-40	0	0,0
0,01	-37	-36	1	-40	-39	1	1,0
0,06	-37	-34	3	-40	-38	2	2,5
0,1	-37	-32	5	-40	-33	7	6,0
0,6	-37	-11	26	-39	-12	27	26,5
1	-37	-2	35	-39	-6	33	34,0
6	-37	+16	53	-39	+18	57	55,0
10	-37	+13	50	-39	+13	52	51,0

Pengukuran V Esel

[urea]	A	B	ΔE_{sel} 1	A	B	ΔE_{sel} 2	Rata-rata ΔE_{sel}
0	-37	-37	0	-40	-39	1	0,5
0,01	-37	-32	5	-40	-37	3	4,0
0,06	-37	-27	10	-40	-32	8	9,0
0,1	-37	-26	11	-40	-28	12	11,5
0,6	-37	-11	26	-39	-5	34	30,0
1	-37	0	37	-39	+1	40	38,5
6	-37	+17	54	-39	+12	51	52,5
10	-37	+4	41	-39	+3	42	41,5

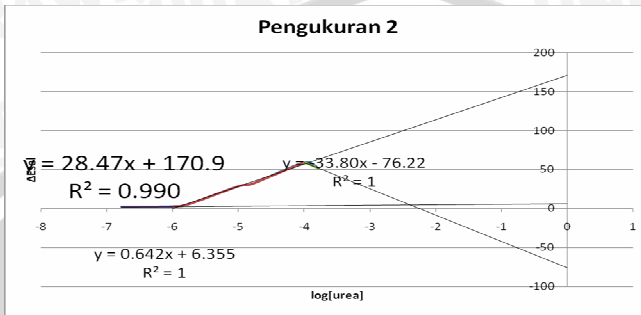
Pengukuran VI Esel

[urea]	A	B	ΔE_{sel} 1	A	B	ΔE_{sel} 2	Rata-rata ΔE_{sel}
0	-37	-38	1	-40	-37	3	2,0
0,01	-37	-26	11	-40	-36	4	7,5
0,06	-37	-26	11	-40	-31	27	19,0
0,1	-37	-21	16	-40	-22	31	24,0
0,6	-37	-16	21	-39	-30	32	26,5
1	-37	-9	28	-39	-17	34	31,0
6	-37	-4	33	-39	-12	39	36,0
10	-37	+8	45	-39	-9	30	37,5

Keterangan: A= E_{sel} hasil pengukuran dengan elektroda gelas (mV)

B= E_{sel} hasil pengukuran dengan biosensor urea (mV)

Contoh penentuan bilangan Nernst pada pengulangan II:



Gambar L.6 Kurva Penentuan Bilangan Nernst Biosensor Potensiometri Urea pada Pengukuran II



Lampiran 7. Penentuan Waktu Respon

Tabel L.7 Hubungan E_{sel} Terhadap Waktu pada Ketebalan Membran Kitosan 0,21 mm, pH=7,3; T=27°C

t(detik)	E_{sel} 0,06 ppm	E_{sel} 0.1 ppm	E_{sel} 0,6 ppm	E_{sel} 1 ppm	E_{sel} 6 ppm
0	-39	-39	-39	-39	-39
10	-39	-39	-38	-37	-38
21	-39	-39	-38	-34	-33
30	-39	-38	-36	-30	-27
40	-39	-38	-35	-27	-21
50	-39	-38	-33	-22	-16
60	-39	-38	-30	-21	-12
70	-39	-38	-28	-18	-8
80	-39	-38	-27	-17	-6
90	-39	-38	-26	-16	-2
100	-39	-37	-24	-14	4
110	-39	-37	-22	-11	8
120	-39	-37	-20	-9	14
130	-39	-36	-18	-7	20
140	-39	-36	-17	-6	20
150	-38	-36	-16	-4	20
160	-38	-36	-14	-3	20
170	-39	-37	-13	-3	20
180	-39	-37	-13	-4	20
190	-38	-37	-13	-4	20
200	-39	-37	-12	-4	20
210	-39	-37	-11	-4	20
220	-39	-37	-11	-4	20
230	-39	-36	-11	-4	20
240	-38	-35	-11	-4	20
250	-38	-35	-11	-4	20

260	-38	-35	-11	-4	20
270	-38	-35	-11	-4	20
280	-37	-35	-11	-4	18
290	-37	-35	-11	-4	16
300	-37	-35	-12	-4	14
310	-37	-35	-11	-4	14
320	-37	-35	-11	-5	14
330	-37	-35	-11	-5	14
340	-37	-35	-11	-5	14
350	-37	-35	-10	-5	14
360	-37	-35	-10	-5	14



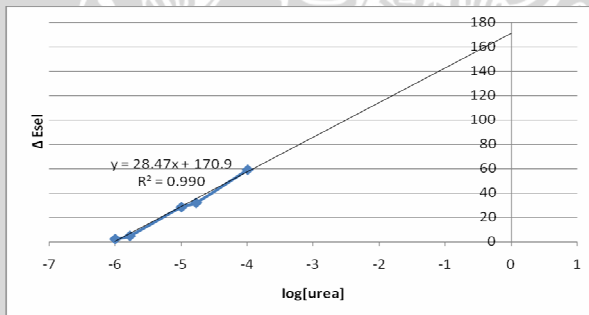
Lampiran 8. Validasi Biosensor Potensiometri Urea

Data E_{sel} Sampel Urin Hasil Pengukuran Elektroda Gelas dan Biosensor Urea dengan Membran Kitosan 0,21 mm pH=7,3; T=27°C

Tabel L.8 Data Potensial Sel Sampel Urin

[urea]	A	B	ΔE_{sel} 1	A	B	ΔE_{sel} 2	Rata-rata ΔE_{sel}
0,235	-37	-22	15	-37	-19	18	16,5
0,3	-37	-19	18	-37	-16	21	19,5
0,45	-37	-12	25	-37	-13	24	24,5
2,35	-35	+10	45	-35	+10	45	45,0
3	-35	+12	47	-35	+14	48	47,5
4,5	-35	+18	53	-35	+18	53	53,0

Keterangan: A= E_{sel} hasil pengukuran dengan elektroda gelas (mV)
B= E_{sel} hasil pengukuran dengan biosensor urea (mV)



Gambar L.8 Kurva Baku Hubungan ΔE_{sel} dan Log [Urea] untuk Penentuan Kadar Urea Sampel Urin

Persamaan kurva baku

$$y = 28,47 x + 170,9$$

Contoh perhitungan kadar urea dalam urin

1. Untuk [urea] = 2,35 ppm

$$\Delta E_{\text{sel}} \text{ rata-rata} = 45 \text{ mV}$$

$$y = 28,47 x + 170,9$$

$$45 = 28,47 x + 170,9$$

$$x = -4,42$$

$$\log \text{ urea} = -4,42$$

$$[\text{urea}] = 3,80 \times 10^{-5} \text{ M}$$

$$= 3,80 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$$

$$= 3,80 \times 10^{-5} \text{ mol/L} \times 60 \text{ g/mol}$$

$$= 2,28 \times 10^{-3} \text{ g/L}$$

$$= 2,28 \text{ mg/L}$$

$$= 2,28 \text{ ppm}$$

$$\text{Kadar sebelum diencerkan} = 2,28 \text{ ppm} \times 100 = 22,8 \text{ ppm}$$

$$\% \text{ kesalahan} = ((22,8 - 23,5) / 23,5) \times 100\%$$

$$= 2,98 \%$$

