

**PENGARUH KETEBALAN MEMBRAN KITOSAN URIKASE
AMOBIL PADA PEMBUATAN BIOSENSOR ASAM URAT**

TUGAS AKHIR

oleh:

UMI ANDARINI

0410920059-92



JURUSAN KIMIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2008

**PENGARUH KETEBALAN MEMBRAN KITOSAN URIKASE
AMOBIL PADA PEMBUATAN BIOSENSOR ASAM URAT**

TUGAS AKHIR

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

oleh:

UMI ANDARINI

0410920059-92



JURUSAN KIMIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2008

LEMBAR PENGESAHAN TUGAS AKHIR

**PENGARUH KETEBALAN MEMBRAN KITOSAN URIKASE
AMOBIL PADA PEMBUATAN BIOSENSOR ASAM URAT**

Oleh:
UMI ANDARINI
0410920059-92

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

Dosen Pembimbing I

Dosen Pembimbing II

Dr. Ani Mulyasuryani, MS
NIP. 131 960 438

Drs. Sutrisno, MSi
NIP. 131 879 407

Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas MIPA
Universitas Brawijaya

M. Farid Rahman, S.Si., M.Si
NIP. 132 158 726

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Umi Andarini
NIM : 0410920059-92
Jurusan : Kimia
Penulis skripsi berjudul :

” Pengaruh Ketebalan Membran Kitosan Urikase Amobil pada Pembuatan Biosensor Asam Urat”

Dengan ini menyatakan bahwa :

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

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, Februari 2008

Yang menyatakan,

Umi Andarini
NIM. 0410920059-92

PENGARUH KETEBALAN MEMBRAN KITOSAN URIKASE AMOBIL PADA PEMBUATAN BIOSENSOR ASAM URAT

ABSTRAK

Biosensor asam urat dapat dirancang dengan melapisi permukaan elektroda gelas menggunakan urikase yang diamobilisasi pada membran kitosan melalui adsorpsi fisik. Urikase akan mengoksidasi asam urat membentuk allantoin, H_2O_2 , dan CO_2 . Hasil CO_2 akan terlarut dalam H_2O membentuk H_3O^+ yang akan menghasilkan potensial sel. Potensial berhubungan dengan kinerja biosensor. Jumlah CO_2 yang dihasilkan dipengaruhi jumlah urikase amobil. Jumlah urikase amobil dapat ditingkatkan dengan memperbesar ketebalan membran kitosan, tetapi peningkatan ketebalan membran kitosan dapat memperlambat analit yang berdifusi ke permukaan membran gelas. Oleh karena itu, dilakukan penelitian mengenai pengaruh ketebalan membran kitosan terhadap kinerja biosensor asam urat. Kinerja biosensor asam urat ditunjukkan oleh bilangan Nernst, kisaran konsentrasi, batas deteksi, dan waktu respon pada ketebalan membran kitosan 8,4 μm ; 10,5 μm ; 11,5 μm ; 13 μm ; dan 14 μm dengan konsentrasi asam urat 5; 10; 15; 20; dan 25 ppm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kinerja biosensor asam urat optimum dicapai pada ketebalan membran kitosan 10,5 μm dengan bilangan Nernst sebesar 28,8 mV/dekade, kisaran konsentrasi asam urat yang dapat diukur adalah 10 ppm hingga 25 ppm, batas deteksi sebesar 9,98 ppm, dan waktu respon biosensor adalah 270 detik.

THE INFLUENCE OF THE IMMOBILIZED URICASE CHITOSAN MEMBRANE THICKNESS ON THE PREPARATION OF URIC ACID BIOSENSOR

ABSTRACT

Uric acid biosensor can be made by coating the surface of the glass electrode with uricase that immobilized in chitosan by physical adsorption. Uricase would oxidize uric acid to form allantoin, H_2O_2 , and CO_2 . The CO_2 gas will react with H_2O to form H_3O^+ that produce E_{sel} . The biosensor performance affected by E_{sel} . Ammount of CO_2 affected by amount of immobilized enzyme. The amount of immobilized enzyme could be rised by increasing chitosan membrane thickness, but the chitosan membrane thickness rises cause the amount of diffusion analyte to glass electrode slowly. This research study about the influence of the chitosan membrane thickness to the performance of uric acid biosensor. The performance of uric acid biosensor showed by characteristics such as Nernstian factor, concentration range, detection limit, and response time. In this research, the optimation of immobilized uricase chitosan membrane thickness was studied towards uric acid character with various thicknesses of 8.4 μm ; 10.5 μm ; 11.5 μm ; 13 μm ; and 14 μm at uric acid concentration 5; 10; 15; 20; and 25 ppm. The result showed that the best performance of uric acid biosensor was gained at 10.5 μm uricase chitosan membrane thickness, Nernstian factor 28.8 mV/decade, while the range of uric acid solution concentration can be measured from 10 ppm up to 25 ppm, the detection limit 9.98 ppm, and biosensor response time was 270 seconds.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pengaruh Ketebalan Membran Kitosan Urikase Amobil pada Pembuatan Biosensor Asam Urat” ini tepat pada waktunya.

Adapun maksud dan tujuan penulisan skripsi ini adalah sebagai sebagian persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Ilmu Kimia dan untuk mengembangkan ilmu pengetahuan dan teknologi dalam menganalisis kadar asam urat menggunakan metode biosensor asam urat dengan membran kitosan urikase amobil.

Dalam penyelesaian skripsi ini banyak pihak yang membantu baik secara langsung maupun tidak langsung. Oleh karena itu, dalam kesempatan yang berbahagia ini penulis merasa berterima kasih kepada :

1. M. Farid Rahman S.Si., M.Si., selaku Ketua Jurusan Kimia Universitas Brawijaya.
2. Dr. Ani Mulyasuryani, M.S., selaku Dosen Pembimbing I yang telah meluangkan tenaga dan waktu untuk membimbing penulis hingga terselesainya penulisan skripsi ini.
3. Drs. Sutrisno, M.Si., selaku Dosen Pembimbing II yang dengan penuh kesabaran memberikan bimbingan dan pengarahan yang berguna dalam penulisan skripsi ini.
4. Ir. Uswatun Hasanah, M.Si., selaku Dosen Penasehat Akademik yang telah memberikan arahan kepada penulis selama menempuh studi di Jurusan Kimia Universitas Brawijaya.
5. Dra. Tutik Setianingsih, M.Si., Elvina Dhiaul Iftitah, S.Si.,M.Si., Ir. Bambang Ismuyanto, M.S., dan Dra. Anna Roosdiana, M.App.Sc., selaku Dosen Penguji.
6. Seluruh dosen dan karyawan Jurusan Kimia Universitas Brawijaya atas segala ilmu dan bantuan yang diberikan.
7. Kedua orang tua, kakak, dan seluruh keluargaku yang memberikan motivasi baik secara materiil maupun spirituil.
8. Teman-teman di Jurusan Kimia dan segenap pihak yang telah memberikan dorongan dan bantuan dalam menyelesaikan skripsi ini.

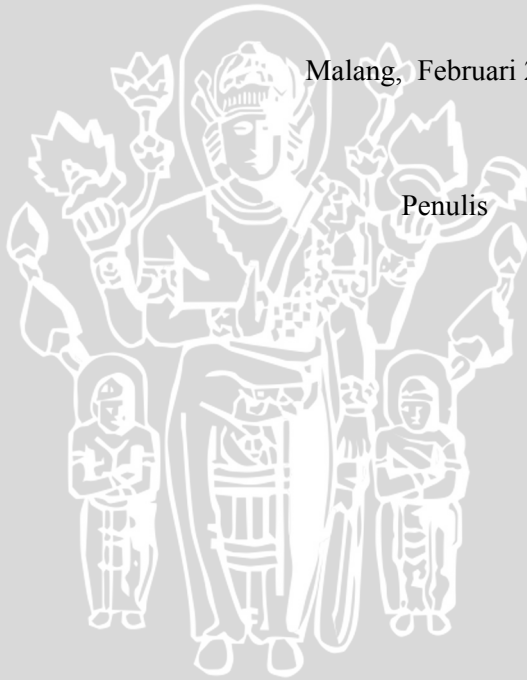
Untuk beliau yang tersebut di atas, penulis hanya dapat mendoakan semoga mendapatkan balasan yang setimpal dari Tuhan Yang Maha Esa.

Karena keterbatasan waktu dan pengetahuan yang ada pada penulis di dalam penyusunan skripsi ini dan masih jauh dari sempurna, untuk itu penulis mengharapkan saran dan kritik yang membangun.

Akhir kata penulis hanya berharap bahwa skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis khususnya, serta bagi rekan-rekan di Universitas Brawijaya Malang dan bagi semua pihak/pembaca.

Malang, Februari 2008

Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Batasan Masalah	3
1.4. Tujuan Penelitian	3
1.5. Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Biosensor	5
2.2. Biosensor Asam Urat.....	6
2.3. Karakteristik Biosensor Asam Urat	15
2.4. Hipotesis	17
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	
3.1. Tempat dan Waktu Penelitian.....	18
3.2. Bahan dan Alat Penelitian	18
3.2.1. Bahan Penelitian.....	18
3.2.2. Bahan Kimia	18
3.2.3. Alat Penelitian	18
3.3. Metode Penelitian	19
3.4. Cara Kerja	19

3.4.1. Pembuatan Biosensor Asam Urat	19
3.4.1.1. Pembuatan Membran Kitosan	19
3.4.1.2. Amobilisasi Urikase.....	19
3.4.1.3. Perancangan Biosensor Potensiometri Asam Urat	20
3.4.2. Pengaruh Ketebalan Membran Kitosan Urikase Amobil	20
3.4.3. Pengolahan Data	21

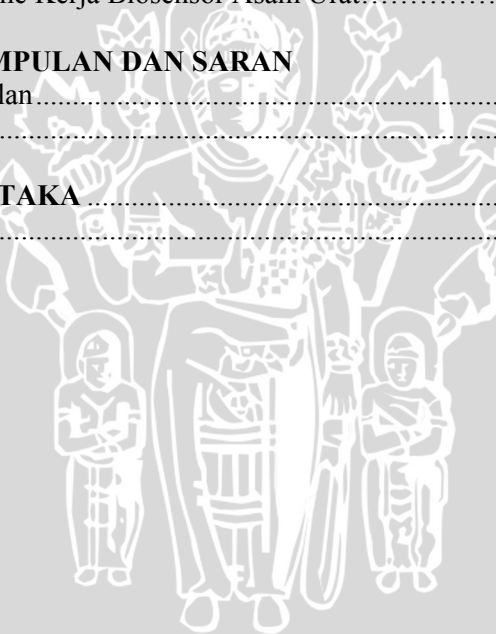
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Pengaruh Ketebalan Membran Kitosan Urikase Amobil terhadap Kinerja Biosensor Asam Urat.....	24
4.2. Karakterisasi Biosensor Asam Urat.....	29
4.3. Mekanisme Kerja Biosensor Asam Urat.....	30

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan.....	32
5.2. Saran.....	32

DAFTAR PUSTAKA	33
LAMPIRAN	36



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. Proses Kerja Biosensor.....	6
Gambar 2.2. Reaksi Oksidasi Asam Urat oleh Urikase	7
Gambar 2.3. Struktur Kitosan.....	10
Gambar 2.4. Kurva Hubungan antara Konsentrasi Substrat Terhadap Kecepatan Reaksi	11
Gambar 2.5. Skema Biosensor Potensiometri Asam Urat	14
Gambar 3.1. Biosensor Asam Urat	20
Gambar 3.2. Kurva Hubungan Antara $-\log$ [Asam Urat] terhadap ΔE_{sel} pada Daerah Linier	21
Gambar 4.1. Kurva Hubungan antara $-\log$ [Asam Urat] terhadap ΔE_{sel}	25
Gambar 4.2. Kurva Hubungan Antara Pengaruh Ketebalan Membran Kitosan Urikase Amobil terhadap Bilangan Nernst.....	27
Gambar 4.3. Kurva Penentuan Waktu Respon dengan Ketebalan Membran Kitosan Urikase Amobil $10,5 \mu\text{m}$	30
Gambar 4.4. Mekanisme Deteksi Asam Urat oleh Biosensor Asam Urat.....	31
Gambar L.4.1. Kurva Baku Kasein.....	52
Gambar L.5.1. Contoh Penentuan Harga Bilangan Nernst, Kisaran Konsentrasi, dan Batas Deteksi	58

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1.	Hasil Pengukuran Potensial Sel (E_{sel}) dan Perubahan Potensial Sel (ΔE_{sel})..... 23
Tabel 4.2.	Kisaran Konsentrasi dan Batas Deteksi Biosensor Asam Urat dengan Pengaruh Ketebalan Membran Kitosan Urikase Amobil..... 28
Tabel L.4.1.	Absorbansi Kasein pada λ_{maks} 544,5 nm 52
Tabel L.4.2.	Kadar Protein Urikase 53
Tabel L.4.3.	Konsentrasi Urikase yang Teramobilkan..... 54
Tabel L.5.1.	Data Hasil Pengukuran Potensial pada Masing-masing Ketebalan Membran Kitosan Urikase Amobil..... 55
Tabel L.5.2.	Data Hasil Pengukuran Waktu Respon..... 57
Tabel L.5.3.	Data Asam Urat Maksimum yang Dapat Diubah..... 59
Tabel L.5.4.	Data Pengukuran Ketebalan Membran Kitosan Menggunakan Mikrometer Sekrup..... 60



DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

LAMPIRAN 1	Diagram Alir Penelitian	36
LAMPIRAN 2	Pembuatan Larutan.....	42
LAMPIRAN 3	Isolasi Urikase dari <i>Candida utilis</i>	49
LAMPIRAN 4	Penentuan Konsentrasi Urikase	52
LAMPIRAN 5	Data Hasil Penelitian.....	55



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Asam urat merupakan hasil akhir metabolisme purin pada manusia. Pada mamalia lain, asam urat dioksidasi oleh urikase menjadi allantoin, H_2O_2 , dan CO_2 (Rawn, 1989). Kadar asam urat dalam darah dapat digunakan sebagai indikator kinerja metabolisme tubuh. Jumlah total asam urat yang diekskresikan oleh manusia normal rata-rata adalah 400-600 mg/24 jam yang dihasilkan dari purin dan degradasi nukleotida purin asam nukleat (Lehninger, 1991). Asam urat dalam darah adalah 2-4 mg/100 mL (Catarow dan Trumper, 1962). Apabila kadar asam urat dalam tubuh melebihi kadar normal mengindikasikan terjadinya penyakit asam urat. Kelebihan asam urat dalam tubuh dapat menyebabkan sendi menjadi nyeri, ngilu, dan sakit karena penimbunan kristal natrium urat secara abnormal. Kelebihan molekul urat yang disimpan dalam tubula ginjal dapat menyebabkan gangguan pada ginjal (Lehninger, 1991). Dengan mengetahui dampak yang ditimbulkan dari kelebihan asam urat dalam tubuh, maka perlu dilakukan pengontrolan terhadap kadar asam urat dalam darah. Upaya pengontrolan kadar asam urat dapat dilakukan dengan analisis kadar asam urat.

Analisis kadar asam urat yang telah dikembangkan adalah penentuan kadar asam urat dengan metode chemiluminesa (CL) menggunakan sistem luminol- $K_3Fe(CN)_6$ - $K_4Fe(CN)_6$ yang didasarkan pada peningkatan dan penurunan intensitas emisi pada CL (Han, *dkk.*, 2005). Meskipun metode ini dapat menentukan kadar asam urat dalam urin dan serum, namun memerlukan waktu yang lama dan dapat terjadi oksidasi asam urat selama selang waktu tersebut. Hal ini menyebabkan kadar asam urat yang terukur memiliki ketidakakuratan sebesar 1,6 % karena sebagian asam urat yang dideteksi telah teroksidasi. Selain metode tersebut, asam urat juga dapat dianalisis dengan metode biosensor potensiometri dengan menggunakan enzim urikase, katalase, dan FcA (ferrocenecarboxysilane acid) yang diamobilisasi dalam 3-glisidiloksopropiltrimetoksilan (GPTS) (Liao, *dkk.*, 2003). Metode ini mempunyai kisaran konsentrasi yang sempit yaitu 2 mg/dL hingga 7 mg/dL dan batas deteksi 3,4 mg/dL sehingga tidak dapat

digunakan untuk menentukan kadar asam urat yang berada di atas kadar normal dan tidak dapat mengukur kadar asam urat secara akurat pada kisaran konsentrasi 2-3,3 mg/dL karena berada di bawah batas deteksi.

Metode yang dikembangkan untuk analisis kadar asam urat adalah menggunakan biosensor potensiometri asam urat. Biosensor asam urat dapat dibuat dengan melapiskan membran kitosan urikase amobil pada permukaan elektroda gelas. Urikase yang digunakan diisolasi dari *Candida utilis* dan diamobilisasi pada membran kitosan dengan metode adsorpsi (Magalhaes dan Machado, 2002). Amobilisasi urikase pada membran kitosan dilakukan agar enzim dapat dipakai secara berulang-ulang, stabil, dan aktivitasnya tidak berkurang pada penyimpanan lama.

Membran kitosan telah dikembangkan untuk amobilisasi kreatinin iminohidrolase untuk menganalisis kreatinin dalam urin. Membran kitosan dibuat dengan melarutkan kitosan dalam larutan asam asetat, dituang di atas plat datar, dipanaskan, dan dilakukan perlakuan tertentu sebelum membran digunakan untuk amobilisasi enzim (Magalhaes dan Machado, 2002). Kitosan digunakan untuk media amobilisasi karena kitosan mempunyai kelebihan yaitu inert, mempunyai kekuatan mekanik yang tinggi, mempunyai konduktivitas listrik, dan bersifat hidrofobik (Minteer dan Tamara, 2006). Selain kitosan, urikase juga dapat diamobilisasi dengan metode penjebakan enzim menggunakan Na-Alginat (Sundari, 1996).

Prinsip kerja dari biosensor asam urat didasarkan pada reaksi oksidasi antara asam urat oleh urikase yang diukur secara elektrokimia. Reaksi oksidasi asam urat oleh urikase menghasilkan alantoin, H_2O_2 , dan CO_2 . Hasil reaksi berupa CO_2 akan bereaksi dengan H_2O membentuk HCO_3^- dan H_3O^+ . Adanya perubahan konsentrasi H_3O^+ akan menghasilkan potensial sel pada elektroda gelas. Potensial sel yang dihasilkan menunjukkan kinerja biosensor asam urat. Kinerja biosensor asam urat dipengaruhi oleh pH dan jumlah urikase amobil. Jumlah urikase amobil dapat ditingkatkan dengan memperbesar ketebalan membran kitosan, tetapi peningkatan ketebalan membran kitosan dapat memperlambat analit yang berdifusi ke permukaan elektroda gelas. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian tentang ketebalan membran kitosan urikase amobil yang dilapiskan pada permukaan elektroda gelas agar dapat diketahui kondisi optimum ketebalan membran kitosan urikase amobil dalam pembuatan biosensor asam urat.

Potensial sel larutan yang terukur menunjukkan kinerja dari biosensor. Kinerja biosensor asam urat dapat diketahui dari beberapa parameter diantaranya adalah bilangan Nernst (kepekaan biosensor), kisaran konsentrasi, batas deteksi, dan waktu respon. Perubahan potensial sel dan jumlah urikase yang teramobilisasi pada membran kitosan ditentukan oleh ketebalan membran. Ketebalan membran kitosan urikase amobil berpengaruh terhadap potensial sel yang dihasilkan oleh reaksi oksidasi asam urat.

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah :

1. bagaimanakah pengaruh ketebalan membran kitosan urikase amobil terhadap kinerja biosensor potensiometri asam urat?
2. bagaimanakah kondisi optimum ketebalan membran kitosan urikase amobil pada biosensor asam urat ?

1.3. Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. urikase yang digunakan merupakan ekstrak kasar hasil isolasi dari *Candida utilis* dengan kadar protein sebesar 2,61 mg/mL.
2. ketebalan membran kitosan urikase amobil yang dipelajari adalah 8,4 μm ; 10,5 μm ; 11,5 μm ; 13 μm ; dan 14 μm .
3. penentuan karakter biosensor asam urat dilakukan dengan pengukuran potensial sel larutan asam urat pada pH 9 dan lama amobilisasi urikase adalah 24 jam.

1.4. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah :

1. mengetahui pengaruh ketebalan membran kitosan urikase amobil terhadap kinerja biosensor potensiometri asam urat.
2. menentukan kondisi optimum ketebalan membran kitosan urikase amobil pada biosensor asam urat.

1.5. Manfaat

Manfaat dalam penelitian ini adalah :

1. untuk merancang biosensor yang didasarkan pada pengaruh ketebalan membran kitosan urikase amobil.

2. untuk memberikan informasi tentang pengaruh ketebalan membran kitosan urikase amobil terhadap kinerja biosensor potensiometri asam urat.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Biosensor

Biosensor merupakan alat yang dilengkapi dengan molekul biologi (bioreseptor) untuk mendeteksi suatu analit (molekul biologi atau substansi kimia) dan secara spesifik mengubah analit menjadi produk yang dapat dideteksi dengan sensor elektrokimia (Pijanowska, *dkk.*, 2005; Hitt, 2005; Adeloju, 1999).

Biosensor tersusun atas tiga bagian yaitu:

1. Bioreseptor

Bioreseptor adalah molekul yang dapat bereaksi dengan analit secara selektif, bioreseptor yang sering digunakan adalah antibodi dan enzim (Hitt, 2005). Bioreseptor yang berupa enzim diamobilisasi pada suatu permukaan transduser (Rao dan Mulchandani, 2005).

2. Transduser yang terletak diantara elemen biologis dan elemen detektor.

Transduser adalah bagian dari biosensor yang dapat mengubah suatu perubahan elektrokimia menjadi suatu sinyal listrik terukur. Ada beberapa jenis transduser yang sering digunakan antara lain:

- a. Amperometri

Transduser amperometri didasarkan pada perubahan arus yang dihasilkan dari reaksi enzimatik dioksidasi atau direduksi pada permukaan elektroda kerja (katoda atau anoda) sehingga terjadi peningkatan arus. Perubahan arus selama proses reduksi atau oksidasi sesuai dengan jumlah zat hasil reaksi enzimatik (Chaplin, 2004).

- b. Konduktometri

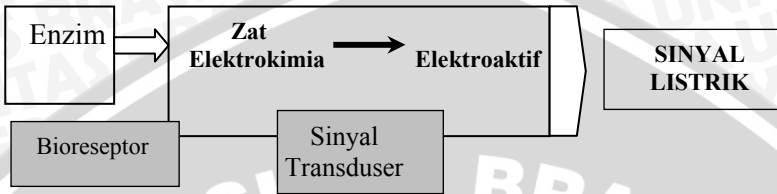
Transduser konduktometri didasarkan pada perubahan konduktivitas diantara dua elektroda (katoda dan anoda) yang dihasilkan dari reaksi enzimatik (Hitt, 2005).

- c. Potensiometri

Transduser potensiometri didasarkan pada pengukuran beda potensial yang disebabkan oleh adanya perubahan jumlah hasil reaksi enzimatik. Adanya hasil reaksi enzimatik dapat mempengaruhi suatu sistem kesetimbangan redoks sehingga dapat menghasilkan perubahan potensial (Chaplin, 2004).

3. Elemen detektor (bekerja secara fisiko kimia).

Proses kerja biosensor dapat ditunjukkan pada Gambar 2.1 (Hitt, 2005).



Gambar 2.1. Proses Kerja Biosensor

2.2. Biosensor Asam Urat

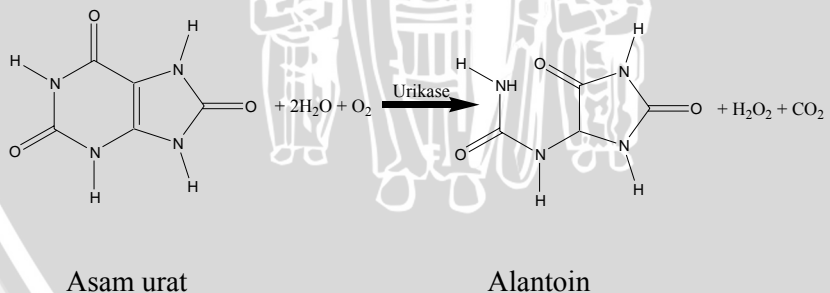
Biosensor asam urat merupakan suatu jenis biosensor yang dapat mendeteksi kadar asam urat dalam tubuh melalui suatu reaksi enzimatik dengan menggunakan urikase yang dapat mengoksidasi asam urat menjadi allantoin, H_2O_2 , dan CO_2 . Pada biosensor potencimetri asam urat digunakan elektroda gelas yang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

Biosensor asam urat dirancang untuk mendeteksi kadar asam urat dalam tubuh melalui reaksi enzimatik. Asam urat (2,6,8-trioxy-purin) merupakan produk akhir metabolisme purin pada manusia, tetapi pada beberapa hewan seperti kura-kura, molusca, dan pada beberapa mamalia selain primata, mensintesis urikase yang mengkatalisis oksidasi asam urat menjadi allantoin (Rawn, 1989). Asam urat yang dideteksi oleh biosensor asam urat mempunyai sifat-sifat sebagai berikut: berupa kristal putih yang tidak berbau dan tidak berasa, larut dalam asam sulfat pekat panas, sedikit larut dalam air, tidak larut dalam alkohol dan eter, larut dalam gliserol, larutan basa hidroksida, natrium asetat, dan natrium fosfat (Hawley's, 1987). Titik lebur asam urat adalah pada temperatur lebih besar dari $400^\circ C$ (terdekomposisi). Asam urat mempunyai dua tetapan asam yaitu $pK_{a1} = 5,78$ dan $pK_{a2} = 10,6$. Pada pH 1 asam urat mempunyai serapan pada panjang gelombang 231 nm dan 293 nm dan koefisien ekstinsi molar (ϵ) adalah $8,3 \times 10$ dan $11,5 \times 10$ cm/mol (Hans, 1963).

Asam urat dideteksi oleh biosensor asam urat melalui reaksi enzimatik dengan menggunakan urikase sebagai katalisator yang dapat mengkatalisis reaksi secara spesifik (Winarno, 1995). Urikase (urate-oksigen oksidoreduktase, E.C. 1.7.3.3) adalah enzim yang mengkatalisis oksidasi asam urat dengan molekul O_2 bertindak sebagai akseptor elektron. Produk dari reaksi enzimatik ini adalah H_2O_2 dan alantoin (Wiseman, 1985). Urikase adalah salah satu golongan oksidase yang memindahkan sepasang elektron dari substrat yaitu asam urat ke oksigen membentuk hidrogen peroksida (Suhartono, 1989). Enzim urikase dapat dipakai dalam diagnosis secara enzimatik untuk penentuan kandungan asam urat dalam serum (Jianguo, *dkk.*, 1994).

Urikase yang digunakan sebagai bioreseptor dalam biosensor asam urat merupakan hasil isolasi dari *Candida utilis*. Karakterisasi urikase yang dihasilkan dari isolasi *Candida utilis* yaitu mempunyai aktivitas maksimum sebesar $(0,3126 \pm 0,002)$ unit (satu unit didefinisikan sebagai banyaknya μmol asam urat yang teroksidasi oleh 1 mL enzim tiap menit) pada kondisi optimum yaitu pH 9,0 ; temperatur 30°C , dan waktu inkubasi 15 menit serta harga V_{maks} adalah $0,58 \mu\text{mol}/\text{menit}/\text{mL}$ enzim dan K_M sebesar 8,37 ppm (Sa'adah, 1996).

Pada hewan vertebrata dan mamalia lainnya, asam urat mengalami degradasi lanjutan menjadi produk ekskresi alantoin dengan bantuan enzim urikase, namun enzim ini tidak terdapat pada primata (Chan, 1957). Menurut Mayes *dkk.* (1987), reaksi konversi asam urat menjadi alantoin sesuai Gambar 2.2.



Gambar 2.2. Reaksi Oksidasi Asam Urat oleh Urikase

Bioreseptor dalam suatu biosensor yang berupa enzim harus diamobilisasi pada suatu permukaan transduser. Enzim urikase hasil isolasi dari *Candida utilis* diamobilisasi pada membran kitosan.

Teknologi amobilisasi enzim berkembang dengan disadarinya beberapa kelemahan sifat enzim yaitu: ketidakstabilan enzim, tingginya biaya isolasi dan pemurnian serta mahalnnya biaya penggunaan enzim karena enzim yang telah dipakai di dalam larutan tidak dapat atau sulit untuk dipisahkan dan dipergunakan lagi padahal selama enzim belum mengalami kerusakan struktur, enzim masih dapat dipakai berulang-ulang.

Amobilisasi enzim adalah suatu keadaan dimana enzim yang secara fisik maupun kimia tidak bebas bergerak sehingga dapat dikendalikan atau diatur kapan enzim harus kontak dengan substrat (Fennema, 1996).

Dalam keadaan bebas, enzim mudah mengalami proses membuka terutama oleh pengaruh temperatur. Proses ini menimbulkan perubahan konformasi dan penurunan aktivitas enzim. Selanjutnya enzim yang membuka lebih mudah mengalami perubahan kimia yang bersifat destruktif.

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 satu *carrier* harus dilaksanakan tanpa merusak struktur ruang tiga dimensi dari sisi aktif enzim sehingga spesifitas substrat tidak terganggu oleh proses amobilisasi.

Dalam amobilisasi, enzim dapat terikat baik secara fisik maupun kimia. Secara fisik, enzim dapat diserap pada suatu matriks yang tidak dapat larut, ditangkap dalam gel atau dikapsulkan dalam mikrokapsul. Secara kimiawi, enzim bisa menjalani pengikatan kovalen dengan bahan penyangga padat atau pengikatan silang (*cross-linked*) (Smith, 1995).

Metode-metode amobilisasi enzim adalah (Belitz dan Grosch, 1987) :

1. Metode *carrier* (pengikatan enzim)

Pada metode ini, enzim terikat pada suatu matriks. Enzim dapat terikat secara kovalen, dalam hal ini berarti enzim terikat secara kimia. Pada beberapa kasus, enzim dapat pula terikat secara fisik.

2. Metode penjebakan enzim

Enzim dijebak dalam kisi suatu polimer (metode kisi) atau di dalam membran semipermeabel (metode mikrokapsul).

3. Metode ikatan silang

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

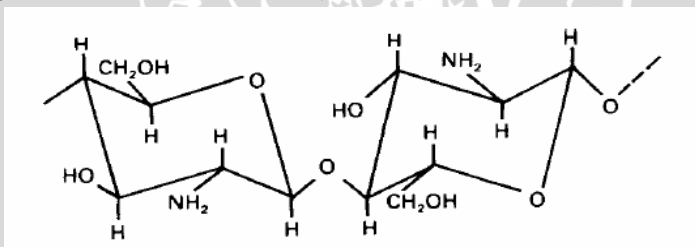
Metode *carrier* merupakan metode yang pertama kali dipakai untuk amobilisasi enzim. Metode ini berdasarkan pada pengikatan enzim secara langsung pada *carrier* dan terdapat tiga macam cara pengikatan yaitu adsorpsi fisik, ikatan ionik, dan ikatan kovalen. Metode adsorpsi fisik berdasarkan pada pengikatan gaya Van der Waals enzim pada permukaan *carrier*. Metode ikatan ionik berdasarkan pada pengikatan ionik protein enzim ke dalam *carrier* tidak larut air yang berisi residu penukar ion, sedangkan metode ikatan kovalen berdasarkan pada pembentukan ikatan kovalen antara enzim dengan *carrier* tidak larut air (Wiseman, 1985).

Dalam metode pengikatan enzim, hal yang perlu diperhatikan adalah ukuran partikel dan luas permukaan *carrier*. Semakin besar luas permukaan *carrier*, maka jumlah enzim yang terikat per unit *carrier* juga semakin besar. Faktor utama yang mempengaruhi jumlah enzim yang dapat diikat oleh *carrier* adalah konsentrasi enzim yang dikenakan pada permukaan *carrier* selama proses amobilisasi. Aktivitas enzim naik dengan meningkatnya konsentrasi enzim sampai pada batas tertentu (Wiseman, 1985). Salah satu cara yang dapat dilakukan untuk mengatur jumlah enzim yang dapat diikat oleh *carrier* adalah dengan cara mengatur ketebalan membran sebagai media amobilisasi yang dalam hal ini digunakan membran kitosan.

Metode amobilisasi enzim yang digunakan dalam pembuatan biosensor asam urat adalah menggunakan metode adsorpsi fisik dengan *carrier* kitosan. Kitosan yang digunakan sebagai media amobilisasi termasuk senyawa kelompok polisakarida. Secara

struktur kimia, kitosan adalah kitin yang telah mengalami deasetilasi (kehilangan gugus asetil) (Kusumawati, 2006). Kitosan merupakan senyawa tidak larut dalam air, larutan basa kuat, sedikit larut dalam HCl dan HNO₃, 0,5% H₃PO₄ sedangkan dalam H₂SO₄ tidak larut. Kitosan juga tidak larut dalam beberapa pelarut organik seperti alkohol, aseton, dometil formamida dan dimetilsulfoksida tetapi kitosan larut baik dalam asam format berkonsentrasi (0,2 -100)% dalam air. 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. Kitosan mempunyai struktur seperti pada Gambar 2.3 (Pasaribu, 2004).

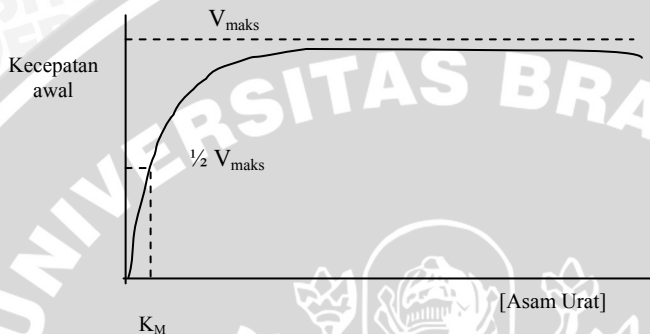
Kitosan dapat digunakan sebagai media amobilisasi suatu enzim dengan metode adsorpsi. Membran kitosan sebagai media amobilisasi dibuat dengan melarutkan kitosan pada asam asetat 0,8%, dituang pada suatu plat datar dan dipanaskan pada temperatur 60°C. Setelah kering akan dihasilkan suatu membran yang kemudian dinetralkan dengan larutan NaOH 1% selama 30 menit, dibilas dengan akuades dan direndam dalam air sampai membran digunakan. Apabila membran akan digunakan untuk mengamobilisasi suatu enzim maka membran terlebih dahulu direndam dalam asam asetat pH 4, dibilas akuades kembali, dan direndam pada larutan enzim (Magalhaes dan Machado, 2002).



Gambar 2.3. Struktur Kitosan

Optimasi kinerja biosensor asam urat dilakukan pada beberapa konsentrasi asam urat sebagai substrat. Pada konsentrasi enzim tetap dan konsentrasi substrat diubah-ubah, maka pada konsentrasi substrat yang sangat rendah, kecepatan reaksi juga sangat rendah. Dengan meningkatnya konsentrasi substrat maka kecepatan reaksi juga meningkat tetapi peningkatan kecepatan reaksi akan semakin kecil sehingga akan dicapai titik batas dimana pada akhirnya penambahan konsentrasi substrat hanya akan meningkatkan

kecepatan reaksi sedemikian kecil. Kondisi tersebut menyebabkan kecepatan reaksi tidak akan pernah mencapai titik maksimum. Batas maksimum tersebut disebut kecepatan maksimum (V_{maks}) karena enzim menjadi jenuh oleh substratnya dan tidak dapat berfungsi lebih cepat (Lehninger, 1991).



Gambar 2.4. Kurva Hubungan antara Konsentrasi Substrat terhadap Kecepatan Reaksi

Pada Gambar 2.4 dapat dilihat bahwa sangat sulit untuk menentukan konsentrasi substrat yang diperlukan untuk mencapai V_{maks} , tetapi oleh karena kurva yang menyatakan hubungan kecepatan reaksi dan konsentrasi substrat ini memiliki bentuk umum yang sama untuk hampir semua enzim, Michaelis-Menten (Lehninger, 1991) mendefinisikan suatu tetapan yang dinyatakan sebagai K_M yang mana K_M bermanfaat untuk menyatakan hubungan yang tepat antara konsentrasi substrat dan kecepatan reaksi enzimatis.

Mekanisme reaksi pada biosensor asam urat adalah sebagai berikut urikase akan mempercepat reaksi oksidasi asam urat menjadi allantoin, H_2O_2 , dan CO_2 . Hasil reaksi berupa CO_2 akan bereaksi dengan H_2O membentuk H_2CO_3 yang akan terionisasi menjadi HCO_3^- dan H_3O^+ sehingga adanya H_3O^+ akan menyebabkan perubahan pH larutan. Adanya perubahan pH akan mengakibatkan perubahan potensial sel (ΔE_{sel}). Perubahan potensial sel (ΔE_{sel}) tersebut dapat dideteksi dengan menggunakan elektroda gelas.

Pada potensiometri, katoda merupakan elektroda indikator dan anoda merupakan elektroda pembanding, sedangkan dari permukaan larutan akan timbul potensial *junction* sehingga

potensial sel elektrokimia (E_{sel}) dituliskan dalam persamaan (Skoog, *dkk.*, 1988) :

$$E_{sel} = E_{ind} - E_{ref1} + E_{lj} \quad (2.1)$$

dimana: E_{ind} = potensial setengah sel elektroda indikator

E_{ref1} = potensial setengah sel elektroda pembanding luar

E_{lj} = potensial *liquid junction*

Reaksi kesetimbangan akan mengubah aktivitas ion H_3O^+ di permukaan elektroda gelas (a_1). Perubahan aktivitas ion H_3O^+ di permukaan elektroda dapat direspon oleh membran gelas. Hal tersebut menyebabkan perubahan potensial membran karena adanya perbedaan antara aktivitas ion di luar elektroda (a_2) dengan aktivitas ion di dalam elektroda (a_1). Hubungan antara potensial sel dengan konsentrasi ion H_3O^+ dalam elektroda gelas yaitu:

$$E_{ind} = E_b + E_{ref2} + E_{asy}$$

$$E_{ind} = 0,0592 \log a_1 - 0,0592 \log a_2 + E_{ref2} + E_{asy} \quad (2.2)$$

Tetapan 1 (K_1)

dengan a_2 : konsentrasi H^+ dalam elektroda (dibuat tetap)

a_1 : konsentrasi H^+ dalam larutan (bagian luar elektroda)

E_{ref2} : elektroda pembanding dalam (tetap)

E_{asy} : potensial asimetri (tetap)

Jika $(-\log a_1) = \text{pH}$ larutan, maka persamaan (2) dapat dituliskan:

$$E_{ind} = K_1 - 0,0592 \text{ pH} \quad (2.3)$$

Substitusi persamaan (3) ke persamaan (1), didapatkan (Soepia dan Lieshout, 1978):

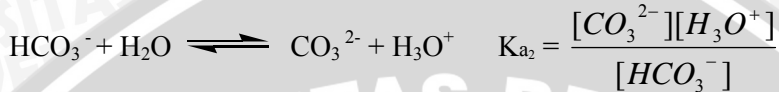
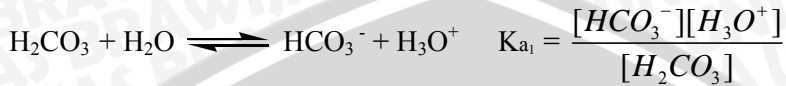
$$E_{sel} = K - E_{ref1} + E_{lj} - 0,0592 \text{ pH}$$

Tetapan 2 (K_2)

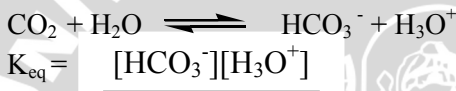
$$E_{sel} = K_2 - 0,0592 \text{ pH} \quad (2.4)$$

Pada reaksi asam urat dengan urikase dapat menghasilkan CO_2 yang setara dengan kadar asam urat, CO_2 dalam larutan akan menghasilkan HCO_3^- dan H_3O^+ sehingga akan terjadi perubahan pH larutan. Oleh karena itu, sensor yang digunakan adalah sensor pH dengan menggunakan elektroda gelas yang dilapisi oleh urikase

amobil. Sedangkan pada larutan, karbondioksida membentuk asam karbonat yang terionisasi dalam air menjadi:



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



$$K_{\text{eq}} = \frac{[\text{HCO}_3^-][\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{CO}_2]}$$

Karena $[\text{CO}_2]$ setara dengan $[\text{H}_2\text{CO}_3]$ yang dihasilkan, maka nilai dari K_{eq} akan setara dengan nilai K_{a1} , sehingga:

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

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

$$[\text{H}_3\text{O}^+] = \frac{-K_{a1} + (K_{a1}^2 + 4 K_{a1} C_{\text{CO}_2})^{1/2}}{2}$$

$$[\text{H}_3\text{O}^+] = (K_{a1} C_{\text{CO}_2})^{1/2}$$

$$\text{pH} = -\frac{1}{2} \log (K_{a1} C_{\text{CO}_2})$$

$$= -\frac{1}{2} \log K_{a1} - \frac{1}{2} \log C_{\text{CO}_2}$$

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

Persamaan tersebut kemudian disubstitusikan pada persamaan elektroda gelas dan didapatkan:

$$E_{\text{sel}} = K_2 - 0,0592 \text{ pH}$$

$$E_{\text{sel}} = K_2 - 0,0592 (K' - \frac{1}{2} \log C_{\text{CO}_2})$$

$$= K_2 - 0,0592 K' + 0,0296 \log C_{\text{CO}_2}$$

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

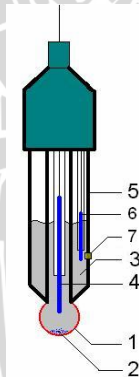
Nilai C_{CO_2} merupakan nilai konsentrasi CO_2 awal hasil dari reaksi asam urat dengan urikase sehingga konsentrasi CO_2 awal akan sama dengan konsentrasi asam urat. Jadi, persamaan yang didapatkan adalah:

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

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

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

Skema biosensor potensiometri asam urat dapat ditunjukkan pada Gambar 2.5.



Gambar 2.5. Skema Biosensor Potensiometri Asam Urat

Bagian dari biosensor asam urat potensiometri tersebut adalah:

1. Bioreseptor (kitosan urikase amobil), yaitu biomolekul yang mengubah asam urat menjadi allantoin, H_2O_2 , dan CO_2 .
2. Membran gelas, yaitu membran yang merespon perubahan konsentrasi H_3O^+ dalam larutan.

3. Larutan internal, biasanya adalah larutan 0,1 M HCl atau larutan KCl.
4. Elektroda internal, biasanya elektroda AgCl atau elektroda kalomel.
5. Badan elektroda, terbuat dari gelas nonkonduktif atau dari plastik.
6. Elektroda pembanding, mengandung elektroda AgCl atau elektroda kalomel.
7. Hubungan dengan larutan yang ditentukan, biasanya terbuat dari keramik atau kapiler dengan asbestos atau serat kuarsa.

Pengaruh ketebalan membran kitosan urikase amobil ditentukan agar enzim dapat teramobil dengan optimal. Selain itu, ketebalan membran kitosan urikase amobil juga berpengaruh terhadap karakteristik biosensor asam urat. Hal ini disebabkan oleh ketebalan membran akan mempengaruhi jumlah asam urat yang mampu melewati membran yang akan membentuk H_3O^+ pada permukaan elektroda gelas sehingga menentukan karakter biosensor asam urat diantaranya adalah bilangan Nernst, kisaran konsentrasi, batas deteksi, dan waktu respon. Secara teoretis diketahui bahwa biosensor yang mengandung lapisan membran yang lebih tebal mempunyai respon yang lebih stabil daripada biosensor dengan lapisan membran kitosan urikase amobil yang lebih tipis, tetapi membran yang terlalu tebal pada biosensor mempunyai waktu respon yang cukup lama (Baronas, *dkk.*, 2003). Hal tersebut berarti bahwa makin tebal membran kitosan urikase amobil yang digunakan menyebabkan jumlah asam urat yang melewati membran menjadi lebih sedikit daripada membran yang lebih tipis.

2.3. Karakteristik Biosensor Asam Urat

Karakteristik biosensor asam urat ditentukan berdasarkan kinerja biosensor. Kinerja biosensor asam urat ini ditentukan melalui beberapa parameter diantaranya adalah bilangan Nernst (kepekaan biosensor), kisaran konsentrasi, batas deteksi, dan waktu respon (Bailey, 1983).

Bilangan Nernst merupakan tingkat kepekaan biosensor terhadap suatu analit tertentu. Bilangan Nernst ditentukan dengan cara membuat kurva hubungan perubahan potensial sel (ΔE_{sel}) terhadap $-\log$ [asam urat]. Besarnya kemiringan garis dari kurva tersebut adalah nilai bilangan Nernst. Bilangan Nernst elektroda yang

semakin mendekati nilai bilangan Nernst teoretis yaitu 29,6 mV/dekade \pm 5 mV/dekade maka kepekaan biosensor akan semakin tinggi (Bailey, 1983). Penentuan harga faktor Nernst biosensor sangat dibutuhkan untuk menentukan kelayakan biosensor yang digunakan dalam suatu analisis.

Kinerja biosensor asam urat dapat dilihat dari kisaran konsentrasi dan batas deteksinya. Kisaran konsentrasi menunjukkan rentang konsentrasi asam urat yang mempunyai hubungan linier antara $-\log$ [asam urat] terhadap ΔE_{sel} . Kisaran konsentrasi dapat diketahui dari grafik hubungan antara perubahan potensial sel (ΔE_{sel}) terhadap $-\log$ [asam urat] yang akan diperoleh suatu garis linier dan nonlinier. Kisaran konsentrasi yang dapat digunakan untuk pengukuran adalah rentang konsentrasi yang masih berada pada daerah linier. Setiap biosensor mempunyai tingkat kepekaan yang berbeda-beda sehingga pada konsentrasi tertentu tidak semua biosensor dapat memberikan perubahan potensial. Jadi, harus diketahui kisaran konsentrasi yang bisa memberikan perubahan potensial terhadap perubahan konsentrasi analit dalam larutan (Bailey, 1983).

Batas deteksi menunjukkan batas konsentrasi terendah yang dapat direspon biosensor. Batas deteksi ditentukan dari kurva hubungan $-\log$ [asam urat] dengan perubahan potensial sel (ΔE_{sel}) pada daerah linier (masih memenuhi persamaan Nernst) dan nonlinier (di luar persamaan Nernst). Titik potong antara kedua daerah tersebut merupakan batas deteksi dari biosensor (Evans, 1991).

Kinerja biosensor juga dapat diketahui dari parameter waktu yaitu berupa waktu respon. Waktu respon yaitu waktu yang diperlukan biosensor dalam merespon suatu analit ketika biosensor tersebut mulai awal dicelupkan ke dalam larutan sampai diperoleh potensial sel yang tetap (stabil). Waktu respon ditentukan dengan mencatat potensial sel pada setiap menit hingga diperoleh harga tetap. Jika semakin cepat suatu biosensor memberikan potensial tetap maka semakin baik pula biosensor yang digunakan (Evans, 1991).

2.4. Hipotesis

Potensial yang dihasilkan bergantung pada jumlah asam urat teroksidasi yang melewati membran kitosan urikase amobil. Jumlah asam urat tersebut dipengaruhi oleh ketebalan membran kitosan. Berdasarkan hal tersebut dapat dibuat hipotesis bahwa ketebalan

membran kitosan urikase amobil mempengaruhi kinerja biosensor asam urat yang meliputi bilangan Nernst, kisaran konsentrasi, batas deteksi, dan waktu respon.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

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

3.2. Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1. Bahan Penelitian

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

3.2.2. Bahan Kimia

Bahan-bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini adalah asam urat, glukosa ($C_6H_{12}O_6$), kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4), ammonium klorida (NH_4Cl), natrium bifosfat (Na_2HPO_4), natrium dihidrogen fosfat (NaH_2PO_4), magnesium sulfat ($MgSO_4 \cdot 5H_2O$), seng (II) sulfat ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$), ekstrak yeast, besi (III) klorida ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$), kalsium klorida ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$), natrium hidroksida ($NaOH$), agar, kalium natrium tartrat ($NaKC_4H_4O_6$), tembaga (II) sulfat ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), glisin, natrium asetat (CH_3COONa), asam asetat glasial 99,8% (CH_3COOH), kitosan (semua bahan kimia yang digunakan memiliki derajat kemurnian pro-*analysis*(p.a), kecuali yang disebutkan lain), dan akuades.

3.2.3. Alat Penelitian

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

3.3. Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode percobaan yang berupa isolasi urikase dari *Candida utilis* (dalam Lampiran 2), amobilisasi ekstrak kasar urikase, pembuatan biosensor asam urat, dan penentuan karakter biosensor asam urat dengan pengaruh ketebalan membran kitosan urikase amobil yaitu pada ketebalan 8,4 μm ; 10,5 μm ; 11,5 μm ; 13 μm ; dan 14 μm . Penentuan pengaruh ketebalan membran kitosan urikase amobil terhadap karakter biosensor asam urat dilakukan 3 kali ulangan. Penentuan karakter biosensor asam urat dilakukan dengan pengukuran potensial sel larutan asam urat pada pH 9 dan lama amobilisasi urikase adalah 24 jam. Parameter yang diamati adalah kinerja biosensor asam urat dengan tahapan penelitian sebagai berikut:

1. Pembuatan biosensor asam urat.
2. Penentuan pengaruh ketebalan membran kitosan urikase amobil terhadap kinerja biosensor asam urat antara lain bilangan Nernst, kisaran konsentrasi, batas deteksi, dan waktu respon.

3.4. Cara Kerja

3.4.1. Pembuatan Biosensor Asam Urat

3.4.1.1. Pembuatan Membran Kitosan

Membran kitosan dibuat dengan cara menimbang kitosan 0,1 g; 0,15 g; 0,2 g; 0,25 g; dan 0,3 g. Masing-masing massa kitosan tersebut dilarutkan dengan 10 mL larutan asam asetat 0,8 % dan diaduk selama 24 jam. Larutan yang terbentuk dituang dan diratakan di atas lempengan kaca berlapis *aluminium foil* dengan ukuran 7,5cm x 7,5cm yang pada bagian tepi kaca telah diberi isolasi. Kemudian lempengan kaca berisi larutan kitosan diangin-anginkan selama 12 jam dan setelah kering dicetak bulat dengan diameter 4 cm.

3.4.1.2. Amobilisasi Urikase

Membran yang telah dicetak dinetralkan dalam larutan NaOH 1 % selama 30 menit, kemudian dibilas dengan akuades, dicelupkan ke dalam larutan asam asetat pH 4 dan dibilas kembali dengan akuades. Setelah itu direndam dalam larutan urikase hasil

isolasi dari *Candida utilis* sebanyak 5 mL pada temperatur 5°C dan lama amobilisasi adalah 24 jam.

3.4.1.3. Perancangan Biosensor Potensiometri Asam Urat

Perancangan biosensor asam urat dilakukan dengan melapiskan membran kitosan urikase amobil yang telah dibilas akuades pada permukaan elektroda gelas dan diikat dengan benang. Biosensor potensiometri asam urat hasil perancangan ditunjukkan pada **Gambar 3.1**.



Gambar 3.1. Biosensor Asam Urat

Pengukuran potensial sel dibandingkan dengan blanko yaitu pengukuran dilakukan tanpa dan dengan menggunakan membran kitosan urikase amobil. Pengukuran potensial sel tanpa dan dengan menggunakan membran kitosan urikase amobil diawali dengan pengukuran *buffer* fosfat pH 9 dan dibaca potensial yang terukur hingga diperoleh potensial sel yang tetap. Pengukuran potensial sel dilakukan dengan pengadukan. Setiap akan dilakukan pengukuran dengan pengaruh ketebalan membran harus dilakukan kalibrasi dengan larutan *buffer* fosfat pada pH 9.

3.4.2. Pengaruh Ketebalan Membran Kitosan Urikase Amobil

Penentuan pengaruh ketebalan membran kitosan urikase amobil dilakukan pada ketebalan membran 8,4 μm ; 10,5 μm ; 11,5 μm ; 13 μm ; dan 14 μm dengan mengukur potensial sel setiap ketebalan membran baik tanpa maupun dengan menggunakan membran. Konsentrasi asam urat yang diukur adalah 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, dan 25 ppm. Setiap pengukuran potensial sel

larutan asam urat dilakukan dengan pengadukan. Hasil yang diperoleh dianalisis dengan cara ditentukan bilangan Nernst (kepekaan biosensor), kisaran konsentrasi, batas deteksi, dan waktu respon.

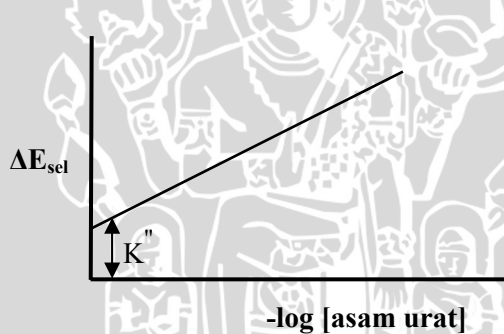
3.4.3. Pengolahan Data

Pengolahan data digunakan untuk menentukan karakteristik biosensor asam urat yang dapat diuraikan sebagai berikut:

Persamaan garis linier untuk menentukan bilangan Nernst (kepekaan biosensor), kisaran konsentrasi, batas deteksi, dan tetapan biosensor adalah :

$$Y = aX + b$$

Dengan Y adalah E_{sel} , a adalah harga bilangan Nernst (mV/dekade), X adalah $-\log [\text{asam urat}]$, dan b adalah tetapan biosensor (K). Adapun kurva hubungan antara $-\log [\text{asam urat}]$ terhadap potensial sel pada daerah linier adalah :



Gambar 3.2. Kurva Hubungan Antara $-\log [\text{Asam Urat}]$ terhadap ΔE_{sel} pada Daerah Linier

Nilai bilangan Nernst diperoleh dari kurva hubungan antara $-\log [\text{asam urat}]$ dengan potensial sel dari pengukuran berbagai konsentrasi asam urat. Kemiringan kurva menunjukkan besarnya bilangan Nernst.

Penentuan kisaran konsentrasi pengukuran dilakukan dengan membuat kurva hubungan potensial sel (ΔE_{sel}) terhadap $-\log [\text{asam urat}]$ pada setiap konsentrasi asam urat yang dipelajari. Kemudian ditentukan daerah yang masih memenuhi persamaan Nernst, yaitu daerah yang memenuhi kisaran konsentrasi pengukuran

yang masih berada dalam daerah linier.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



Batas deteksi ditentukan dengan kurva hubungan antara $-\log [\text{asam urat}]$ dan ΔE_{sel} dari pengukuran beberapa konsentrasi larutan asam urat. Titik potong antara garis singgung daerah yang masih memenuhi persamaan Nernst (daerah linier) dan daerah di luar Nernst (daerah nonlinier) dengan menentukan persamaan garis singgung pada setiap daerah. Nilai absis (sumbu X) dari titik potong antara kedua daerah tersebut menunjukkan nilai batas deteksi dari biosensor asam urat.

Pengukuran waktu respon dilakukan pada ketebalan membran kitosan urikase dan kisaran konsentrasi optimum. Waktu respon ditentukan dengan mengukur harga E_{sel} baik tanpa maupun dengan membran kitosan urikase amobil pada setiap 30 detik selama 6 menit. Hasil yang diperoleh dibuat kurva hubungan antara perubahan potensial sel (ΔE_{sel}) larutan asam urat terhadap waktu pengukuran. Berdasarkan kurva tersebut ditentukan waktu respon biosensor asam urat yaitu waktu pada saat potensial sel relatif tetap.



BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

Biosensor potensiometri asam urat tersusun atas elektroda gelas yang dilapisi dengan urikase amobil. Amobilisasi urikase dilakukan dengan menggunakan kitosan sebagai pengemban melalui metode adsorpsi fisik (Magalhaes dan Machado, 2002). Urikase sebagai *bioreseptor* diisolasi dari *Candida utilis*. Amobilisasi enzim dilakukan dalam 5 mL urikase pada *buffer* glisin pH 8,5; temperatur 5°C; dan selama 24 jam. Ketebalan membran kitosan yang diteliti adalah 8,4 µm; 10,5 µm; 11,5 µm; 13 µm; dan 14 µm, serta konsentrasi asam urat yang diukur adalah 5 ppm; 10 ppm; 15 ppm; 20 ppm; dan 25 ppm.

Potensial sel (E_{sel}) diukur tanpa menggunakan membran dan dengan menggunakan membran kitosan urikase amobil. Pengukuran tanpa menggunakan membran urikase amobil digunakan sebagai blanko. Selisih potensial sel yang didapatkan (ΔE_{sel}) dari kedua pengukuran merupakan bukti adanya aktivitas urikase terhadap asam urat. Hasil pengukuran potensial sel ditunjukkan pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1. Hasil Pengukuran Potensial Sel (E_{sel}) dan Perubahan Potensial Sel (ΔE_{sel})

$C_{\text{Asam urat}}$ (ppm)	E_{sel} tanpa membran (mV)	E_{sel} dengan membran (mV)	ΔE_{sel} (mV)
5	-87	-67	20
10	-95	-71	24
15	-94	-77	17
20	-95	-81	14
25	-91	-81	10

Hasil pengukuran potensial sel pada Tabel 4.1 dilakukan pada ketebalan membran kitosan 10,5 µm. Apabila dibandingkan antara pengukuran E_{sel} tanpa dan dengan menggunakan membran kitosan urikase amobil terjadi kenaikan harga E_{sel} untuk setiap konsentrasi asam urat. Kenaikan harga E_{sel} setelah dilakukan pengukuran menggunakan membran urikase amobil disebabkan oleh adanya urikase yang akan mengoksidasi asam urat menjadi alantoin, H_2O_2 , dan CO_2 . Hasil CO_2 akan bereaksi dengan H_2O membentuk

H_3O^+ dan HCO_3^- sehingga adanya peningkatan konsentrasi H_3O^+ akan meningkatkan E_{sel} yang terukur. Hal ini sesuai dengan persamaan (2.5) bahwa jumlah konsentrasi H_3O^+ adalah sebanding dengan harga E_{sel} (Soepia dan Lieshout, 1978). Dari Tabel 4.1 dapat disimpulkan bahwa enzim dapat bekerja karena adanya perubahan harga E_{sel} tanpa dan dengan menggunakan urikase amobil sehingga diperoleh nilai ΔE_{sel} yang bernilai positif.

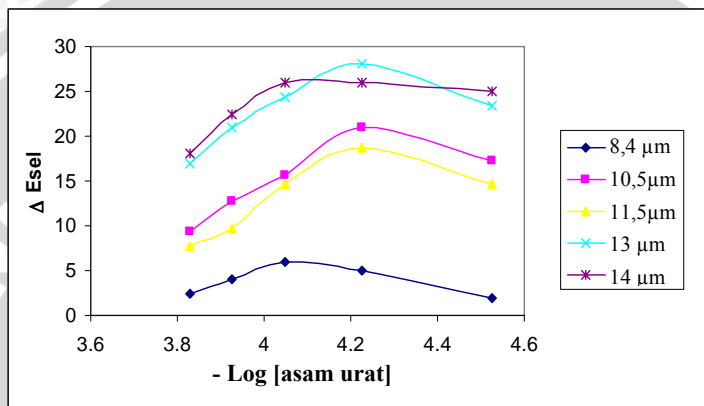
Pada konsentrasi asam urat 5 ppm mempunyai harga ΔE_{sel} sebesar 20 mV dan naik menjadi 24 mV pada konsentrasi asam urat 10 ppm. Peningkatan sebesar 4 mV dari konsentrasi asam urat 5 ppm hingga 10 ppm disebabkan oleh adanya penambahan konsentrasi H_3O^+ akibat adanya aktivitas enzim dalam mengoksidasi asam urat. Apabila konsentrasi asam urat dinaikkan hingga 25 ppm maka ΔE_{sel} akan mengalami penurunan. Penurunan harga ΔE_{sel} karena peningkatan konsentrasi asam urat mengakibatkan kesetimbangan reaksi cepat tercapai sehingga tidak semua konsentrasi H_3O^+ terukur.

Pada konsentrasi asam urat 10 ppm mempunyai ΔE_{sel} 24 mV, jika konsentrasi asam urat dinaikkan 1,5 kali; 2 kali; dan 2,5 kali menjadi 15 ppm; 20 ppm; dan 25 ppm maka ΔE_{sel} yang dihasilkan mengalami penurunan 1,4 kali; 1,7 kali; dan 2,4 kali. Penurunan ΔE_{sel} yang terjadi tidak sesuai dengan kenaikan konsentrasi asam urat. Hal ini disebabkan tidak semua gas CO_2 larut dalam air. Kelarutan CO_2 dalam air adalah sebesar 90 cm^3 dalam 100 mL (Reid, *dkk.*, 1987) sehingga H_3O^+ yang terukur tidak sesuai dengan konsentrasi asam urat.

4.1. Pengaruh Ketebalan Membran Kitosan Urikase Amobil terhadap Kinerja Biosensor Asam Urat

Pengaruh ketebalan membran kitosan urikase amobil terhadap kinerja biosensor asam urat dilakukan dengan mengatur ketebalan membran kitosan. Ketebalan membran kitosan diatur berdasarkan massa kitosan yang dilarutkan untuk membran sehingga diperoleh membran kitosan dengan ketebalan 8,4 μm ; 10,5 μm ; 11,5 μm ; 13 μm ; dan 14 μm . Ketebalan membran kitosan diukur menggunakan mikrometer sekrup. Amobilisasi urikase dilakukan dengan merendam membran kitosan dalam 5 mL urikase selama 24 jam. Pengukuran potensial sel dilakukan pada pH 9 karena pada pH 9 aktivitas urikase mencapai maksimum. Hasil pengukuran ΔE_{sel} yang didapatkan dibuat grafik hubungan ΔE_{sel} dengan $-\log [\text{asam urat}]$. Grafik tersebut ditunjukkan oleh Gambar 4.1.

Dari Gambar 4.1 terlihat bahwa profil pada berbagai ketebalan membran kitosan yang dipelajari mempunyai hubungan antara $-\log [\text{asam urat}]$ terhadap ΔE_{sel} yang sama yaitu meningkat. Hal ini berarti bahwa konsentrasi asam urat berbanding terbalik dengan ΔE_{sel} , tetapi mempunyai kemiringan yang berbeda.



Gambar 4.1. Grafik Hubungan antara $-\log [\text{Asam Urat}]$ terhadap ΔE_{sel}

Pada ketebalan membran 8,4 μm dan 14 μm mempunyai harga ΔE_{sel} yang kecil sehingga diperoleh kurva dengan kemiringan yang landai, tetapi mempunyai kisaran konsentrasi yang berbeda. Hal tersebut disebabkan oleh jumlah enzim yang teramobilisasi yang berbeda. Jumlah enzim yang teramobilisasi pada ketebalan membran 8,4 μm adalah 7,35 mg yang lebih kecil daripada membran 14 μm dengan jumlah enzim 11,07 mg. Hal ini menunjukkan bahwa ketebalan membran berpengaruh terhadap jumlah enzim yang teramobilisasi. Pada membran 8,4 μm dengan jumlah enzim amobil yang rendah menyebabkan perubahan konsentrasi H_3O^+ dan harga ΔE_{sel} menjadi rendah. Sedangkan pada membran 14 μm meskipun mempunyai jumlah enzim amobil lebih besar, namun membran 14 μm terlalu tebal sehingga jarak antara larutan analit dengan permukaan lapisan elektroda gelas menjadi lebih lebar. Membran yang terlalu tebal dapat memperlambat analit yang berdifusi ke permukaan membran gelas.

Pada ketebalan membran 10,5 μm ; 11,5 μm ; dan 13 μm mempunyai kemiringan kurva yang berbeda. Perbedaan kemiringan

kurva pada ketiga membran disebabkan oleh jumlah enzim yang teramobilisasi juga berbeda yaitu berturut-turut 11,34 mg; 11,31 mg; dan 11,29 mg. Akan tetapi, ketiga membran mempunyai kisaran konsentrasi yang lebar sehingga diperkirakan bahwa kondisi optimum terdapat pada ketebalan membran 10,5 μm ; 11,5 μm ; dan 13 μm .

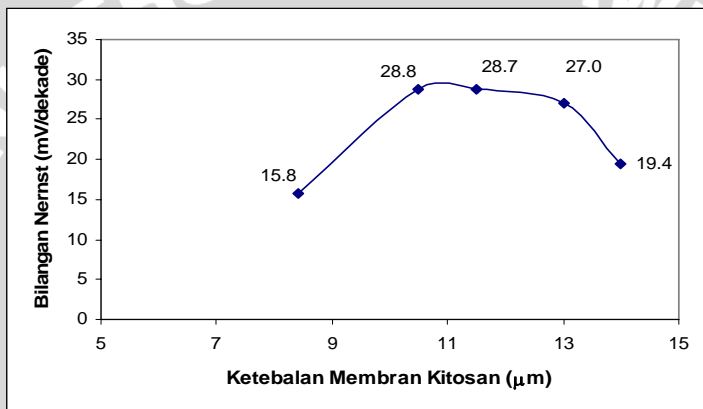
Berdasarkan hasil penelitian penentuan massa urikase teramobilisasi (Lampiran 4) dapat diketahui bahwa pada ketebalan membran 8,4 μm jumlah urikase yang teramobilisasi sebesar 7,35 mg. Pada membran 8,4 μm konsentrasi kitosan yang digunakan yaitu 1 g/10 mL sehingga ikatan hidrogen antarrantai yang terbentuk menjadi sedikit dan ukuran pori-pori menjadi besar. Apabila ukuran pori-pori besar maka jumlah enzim yang teramobilisasi menjadi sedikit karena lebih banyak enzim yang lolos. Pada ketebalan membran 10,5 μm jumlah enzim teramobilisasi naik menjadi 11,34 mg, tetapi pada ketebalan 11,5 μm ; 13 μm ; dan 14 μm jumlah enzim teramobilisasi mengalami penurunan. Hal ini disebabkan pada saat konsentrasi kitosan bertambah maka ikatan hidrogen antarrantai menjadi bertambah pula sehingga ukuran pori-pori mengecil. Apabila ukuran pori-pori mengecil maka enzim yang teramobilisasi menjadi sedikit (Pourjavadi dan Mahdavinia, 2006).

Kepekaan biosensor asam urat ditentukan dari harga kemiringan grafik hubungan ΔE_{sel} dengan $-\log [\text{asam urat}]$ pada rentang kisaran konsentrasi asam urat yang ditunjukkan pada Gambar 4.1. Kepekaan biosensor dinyatakan oleh bilangan Nernst. Berdasarkan harga bilangan Nernst yang diperoleh, dibuat grafik hubungan antara bilangan Nernst dengan ketebalan membran kitosan. Grafik tersebut ditunjukkan oleh Gambar 4.2.

Pada Gambar 4.2 menunjukkan bahwa harga bilangan Nernst meningkat antara membran 8,4 μm dan 10,5 μm , tetapi pada ketebalan membran lebih dari 10,5 μm harga bilangan Nernst menurun sesuai dengan jumlah enzim yang teramobilisasi pada membran kitosan.

Pada ketebalan membran kitosan antara 8,4 μm dan 10,5 μm terjadi kenaikan bilangan Nernst sebesar 13 mV/dekade karena pada membran 8,4 μm , jumlah urikase teramobilisasi hanya 7,35 mg sehingga jumlah asam urat yang mampu diubah adalah 0,741 mg. Hal ini menyebabkan pada konsentrasi asam urat yang sama akan menghasilkan ΔE_{sel} yang kecil sehingga pada membran 8,4 μm mempunyai bilangan Nernst yang kecil yaitu 15,8 mV/dekade. Pada

ketebalan membran kitosan 10,5 μm mempunyai harga bilangan Nernst 28,8 mV/dekade yang hampir mendekati harga bilangan Nernst teoretis yaitu 29,6 mV/dekade. Hal ini terjadi karena jumlah urikase yang teramobilisasi adalah 11,34 mg dan mampu mengubah 1,144 mg asam urat sehingga untuk konsentrasi asam urat yang sama akan menghasilkan jumlah CO_2 yang lebih banyak karena reaksi terjadi lebih cepat. Apabila reaksi berlangsung cepat maka produk H_3O^+ yang dihasilkan meningkat sehingga perbedaan ΔE_{sel} pada masing-masing konsentrasi asam urat menjadi besar.



Gambar 4.2. Kurva Hubungan antara Ketebalan Membran Kitosan terhadap Bilangan Nernst

Pada ketebalan membran 11,5 μm dan 13 μm terjadi kenaikan ketebalan membran, namun jumlah enzim yang teramobilisasi menurun yaitu 11,31 mg dan 11,29 mg sehingga asam urat yang mampu diubah adalah 1,141 mg dan 1,139 mg. Penurunan harga bilangan Nernst terjadi sesuai dengan penurunan jumlah enzim teramobilisasi karena menyebabkan kesetimbangan reaksi dan harga ΔE_{sel} turun. Pada ketebalan membran 14 μm harga bilangan Nernst mengalami penurunan yang tajam sebesar 9,4 mV/dekade. Hal ini menunjukkan bahwa makin tebal membran dapat menurunkan kepekaan biosensor karena dapat menurunkan ukuran pori-pori membran kitosan (Pourjavadi dan Mahdavinia, 2006) sehingga enzim yang teramobilisasi menurun dan juga dapat menghambat difusi analit menuju permukaan membran gelas.

Kesalahan harga bilangan Nernst pada ketebalan membran 8,4 μm ; 10,5 μm ; 11,5 μm ; 13 μm ; dan 14 μm apabila dibandingkan terhadap bilangan Nernst teoretis 29,6 mV/dekade mempunyai kesalahan sebesar 46,6 %; 2,7 %; 3,0 %; 8,8 %; dan 34,4 %. Berdasarkan harga kesalahan tersebut maka ketebalan membran optimum dicapai pada membran 10,5 μm karena mempunyai persentase kesalahan paling kecil terhadap bilangan Nernst teoretis.

Pengaruh ketebalan membran kitosan urikase amobil juga didasarkan pada kinerja biosensor lainnya yaitu kisaran konsentrasi dan batas deteksi. Kisaran konsentrasi menunjukkan rentang konsentrasi asam urat yang memiliki hubungan linier antara $-\log [\text{asam urat}]$ terhadap ΔE_{sel} . Sedangkan batas deteksi menunjukkan konsentrasi asam urat terendah yang masih dapat dideteksi oleh biosensor asam urat. Kisaran konsentrasi dan batas deteksi biosensor asam urat ditunjukkan pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2. Kisaran Konsentrasi dan Batas Deteksi Biosensor Asam Urat dengan Pengaruh Ketebalan Membran Kitosan Urikase Amobil

Ketebalan Membran Kitosan (μm)	Kisaran Konsentrasi	Batas Deteksi (ppm)
8,4	15ppm-25ppm	14,71
10,5	10ppm-25ppm	9,98
11,5	10ppm-25ppm	10,16
13	10ppm-25ppm	10,27
14	10ppm-25ppm	10,74

Berdasarkan Tabel 4.2, dapat diketahui bahwa pada ketebalan membran kitosan 8,4 μm mempunyai kisaran konsentrasi yang sempit yaitu 15 ppm hingga 25 ppm. Hal ini disebabkan pada ketebalan membran 8,4 μm mempunyai jumlah urikase amobil yang kecil yaitu 7,35 mg sehingga jumlah H_3O^+ yang dihasilkan dan perubahan ΔE_{sel} terhadap konsentrasi asam urat menurun. Oleh karena itu, pada membran 8,4 μm bukan merupakan kondisi optimum karena memiliki kisaran konsentrasi yang sempit.

Pada ketebalan membran 10,5 μm ; 11,5 μm ; 13 μm ; dan 14 μm mempunyai kisaran konsentrasi yang sama yaitu 10 ppm hingga 25 ppm. Jika didasarkan pada kisaran konsentrasi maka ketebalan membran optimum tidak dapat ditentukan. Akan tetapi, berdasarkan penentuan kinerja biosensor yang lain yaitu batas deteksi diperoleh

bahwa pada ketebalan membran 10,5 μm dengan bilangan Nernst 28,8 mV/dekade mempunyai batas deteksi terendah yaitu 9,98 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa pada ketebalan membran 10,5 μm , jumlah asam urat yang melewati membran dan jumlah hasil reaksi mencapai optimum sehingga dapat meningkatkan kepekaan biosensor yang ditandai dengan kecilnya batas deteksi.

4.2. Karakterisasi Biosensor Asam Urat

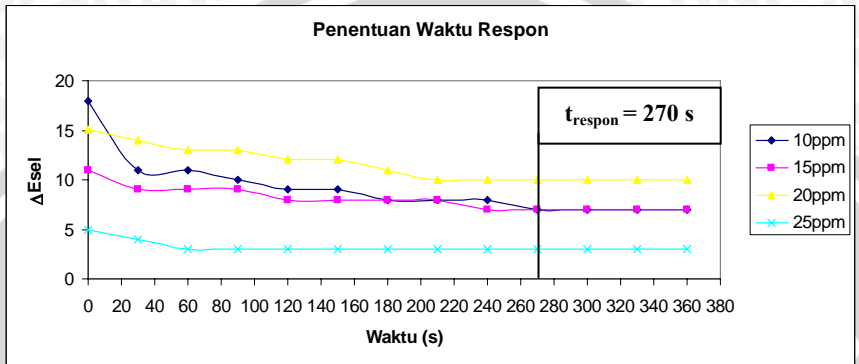
Karakter biosensor asam urat dengan pengaruh ketebalan membran kitosan urikase amobil diketahui dari parameter bilangan Nernst (kepekaan biosensor), kisaran konsentrasi, batas deteksi, dan waktu respon. Salah satu karakter yang belum ditentukan adalah waktu respon.

Biosensor asam urat membutuhkan waktu tertentu untuk dapat merespon asam urat dalam larutan. Waktu respon biosensor asam urat dalam penelitian ini ditentukan dengan mengetahui lama biosensor untuk memberikan potensial sel yang tetap (stabil), yang menunjukkan telah tercapainya kesetimbangan reaksi.

Waktu respon ditentukan dengan mengukur harga ΔE_{sel} setiap 30 detik. Waktu respon ditentukan pada kondisi optimum yaitu pada kisaran konsentrasi 10 ppm hingga 25 ppm dan pada ketebalan membran kitosan 10,5 μm yang mempunyai bilangan Nernst sebesar 28,8 mV/dekade. Hal ini disebabkan pada kondisi tersebut kemampuan biosensor untuk merespon suatu analit mencapai optimum sehingga diharapkan waktu yang diperlukan oleh biosensor asam urat untuk memberikan harga ΔE_{sel} yang stabil akan lebih cepat. Hasil yang diperoleh dibuat grafik hubungan antara waktu dan ΔE_{sel} untuk setiap kisaran konsentrasi. Grafik tersebut ditampilkan pada Gambar 4.3.

Berdasarkan Gambar 4.3 menunjukkan bahwa pada ketebalan membran kitosan dan jumlah enzim yang sama maka yang berpengaruh terhadap waktu adalah konsentrasi asam urat. Hubungan antara ΔE_{sel} dengan waktu pada konsentrasi asam urat 10 ppm hingga 25 ppm mempunyai waktu respon yang berbeda untuk mencapai harga potensial sel yang stabil. Pada konsentrasi asam urat 25 ppm; 20 ppm; 15 ppm; dan 10 ppm mempunyai waktu respon sebesar 60 detik; 210 detik; 240 detik; dan 270 detik. Hubungan antara reaksi oksidasi asam urat oleh urikase dengan peningkatan konsentrasi asam urat berlangsung sesuai dengan Gambar 2.4. Apabila konsentrasi asam urat meningkat maka laju reaksi dan tercapainya

kesetimbangan reaksi berlangsung cepat sehingga waktu respon menjadi pendek (Lehninger, 1991).



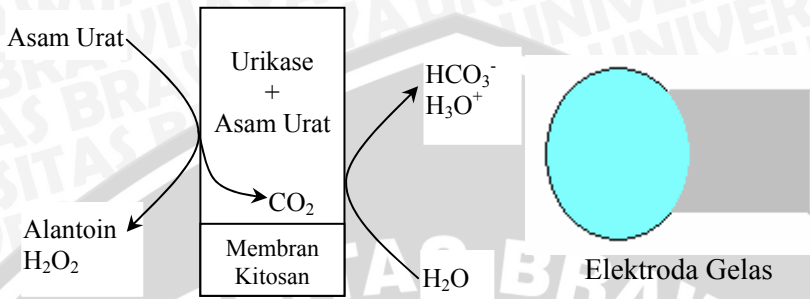
Gambar 4.3. Grafik Hubungan antara ΔE_{sel} dengan Waktu pada Ketebalan Membran Kitosan 10,5 μm

Waktu respon biosensor asam urat pada penelitian ini adalah 270 detik. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pada rentang konsentrasi 10 ppm hingga 25 ppm, kesetimbangan reaksi pada saat pengukuran telah tercapai setelah 270 detik. Hal tersebut ditunjukkan oleh harga ΔE_{sel} yang tetap.

4.3. Mekanisme Kerja Biosensor Asam Urat

Berdasarkan pengukuran potensial sel pada berbagai konsentrasi asam urat dan ketebalan membran yang berbeda mempunyai ΔE_{sel} yang berbeda pula. Hal ini membuktikan bahwa perubahan konsentrasi H_3O^+ akibat reaksi oksidasi asam urat terjadi pada permukaan elektroda yang menimbulkan perubahan potensial sel. Oleh karena itu, mekanisme kerja biosensor asam urat dimungkinkan sesuai Gambar 4.4.

Urikase yang telah diamobilisasi pada permukaan membran kitosan menyebabkan terjadinya reaksi enzimatik sehingga asam urat yang melewati pori-pori kitosan akan bereaksi dengan urikase dalam membran membentuk CO_2 , H_2O_2 , dan alantoin (Gambar 4.4). Reaksi antara CO_2 dan H_2O menghasilkan ion HCO_3^- dan H_3O^+ . Penambahan konsentrasi H_3O^+ dalam larutan akan menurunkan pH dan akan dideteksi oleh elektroda gelas sebagai potensial sel (E_{sel}). Pengukuran potensial sel dibandingkan terhadap blanko sehingga akan diperoleh nilai selisih potensial sel (ΔE_{sel}).



Gambar 4.4. Mekanisme Deteksi Asam Urat oleh Biosensor Asam Urat



BAB V

PENUTUP

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat ditarik kesimpulan bahwa kinerja biosensor asam urat dipengaruhi oleh ketebalan membran kitosan urikase amobil. Peningkatan ketebalan membran kitosan urikase amobil lebih dari 10,5 μm dapat menurunkan harga bilangan Nernst. Pada ketebalan membran kitosan urikase amobil 10,5 μm kepekaan biosensor asam urat mencapai maksimum dengan bilangan Nernst sebesar 28,8 mV/dekade. Pada kondisi optimum biosensor asam urat mempunyai batas deteksi 9,98 ppm, kisaran konsentrasi 10 ppm hingga 25 ppm dengan waktu respon 270 detik.

5.2. Saran

Untuk menurunkan batas deteksi dapat dilakukan dengan menaikkan aktivitas enzim sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai teknik amobilisasi urikase untuk biosensor asam urat.

DAFTAR PUSTAKA

- Adeloju, S., 1999, Biosensing Technology, Centre for Electrochemical Research and Analytical Technology, www.biosens_tech.html, diakses pada tanggal 8 April 2007
- Baronas, R., Ivanauskas, F., dan Kulys, J., 2003, The Influence Of The Enzyme Membrane Thickness On The Response Of Amperometric Biosensors, *Sensors*; **3**, 248-262
- Bailey, P.L., 1983, **Analysis with Ion Selective Electrode**, Heyden dan Sons Ltd., London, hal. 20-24
- Belitz, H.D., dan Grosch, W., 1987, **Food Chemistry**, Springer-Verlag, Berlin, hal. 118-120
- Catarow, A., dan Trumper, M., 1962, **Clinical Biochemistry**, W.B. Saunders Company, Philadelphia, hal. 519-520
- Chan, A., 1957, **Biochemistry**, The Macmillan Company, New York, hal. 377, 602, 811-812
- Chaplin, M., 2004, **Potentiometric Biosensors**, Faculty of Engineering, Science and The Built Environment, South Bank University, London, hal. 626
- Evans, A., 1991, **Potentiometric and Ion Selective Electrodes**, John Willey and Sons, New York, hal. 577-580
- Fennema, O.R., 1996, **Food Chemistry**, 3rd ed., Marcell Dekker, Inc., New York, hal. 455, 504
- Han, S., Liu, E., dan Li, H., 2005, Cetyltrimethylammonium Bromide-enhanced Chemiluminescence Determination of Uric Acid Using a Luminol-Hexacyanoferrate (III)-Hexacyanoferrate System, *Anal. Sci.*; **21**, 111-114
- Hans, 1963, **Methods Of Enzymatic Analysis**, Academic Press, New York, hal. 500-501
- Hawley's, I.R., 1987, **Condensed Chemical Dictionary**, 11th ed., Van Nostrand Reinhold, New York
- Hitt, E., 2005, Label-Free, Optical, Acoustic, and Calorimetric Analytical Methods do not Alter the Protein of Interest, but

They have Complications of Their Own Diagram of Typical Biosensor Mechanisms, Drug Discovery Development, www.ddmag.com, diakses pada tanggal 21 Agustus 2007, hal. 1-2

- Jianguo, L., Gaoxiang, L., Hong, L., dan Xiukai, Z., 1994, Purification and Properties Of Uricase From *Candida* sp. And Its Application In Uric Acid Analysis In Serum, *J. Micro.*; **47**, 57-63
- Kusumawati, Y., 2006, **Mengenal Lebih Dekat Kitosan**, ITB, Bandung, hal. 1
- Lehninger, A.L., 1991, **Dasar-dasar Biokimia**, Jilid I, Terjemahan Therawijaya, Erlangga, Jakarta, hal. 335-336
- Liao, C.W., Chou, J.C, Sun, T.P., Hsiung, S.K., and Hsieh, J.H., 2003, **Study on The Uric Acid Biosensor By The Potentiometric Principle**, Institute of Biomedical Engineering, Taiwan, hal. 1-10
- Magalhaes, J.M.C.S., dan Machado, A.A.S.C., 2002, Array Of Potentiometric Sensors Of Creatinine In Urine Samples, *The Analyst*; **127**, 1069-1070
- Mayes, A.P., Martin, D.W., Granner, D.K., dan Rodwell, V.W., 1987, **Biokimia Harper**, Alih bahasa : Dr. Iyan Dharmawan, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta, hal. 90-95
- Minter, S., dan Tamara, K., 2006, Nanopore Engineering of Chytosan Polymer for Enzyme Immobilization and Stabilization, [http://www. Aiche.org.pdf](http://www.Aiche.org.pdf), hal. 1-2
- Pasaribu, N., 2004, **Berbagai Ragam Pemanfaatan Polimer**, Jurusan Kimia Universitas Sumatera Utara, Medan, hal. 5-7
- Pijanowska, D.G., Dawgul, M., and Torbich, W., 2005, Comparison of Urea Determination in Biological Samples by Enfets Based on pH and pNH₄ Detection, *Sensors*; **2**, 160-161
- Pourjavadi, A., dan Mahdavinia, G.R., 2006, Superabsorbency, pH-Sensitivity and Swelling Kinetics of Partially Hydrolyzed Chitosan-9-poly (Acrylamide) Hydrogels, *J. Chem.*; **30**, 595-608

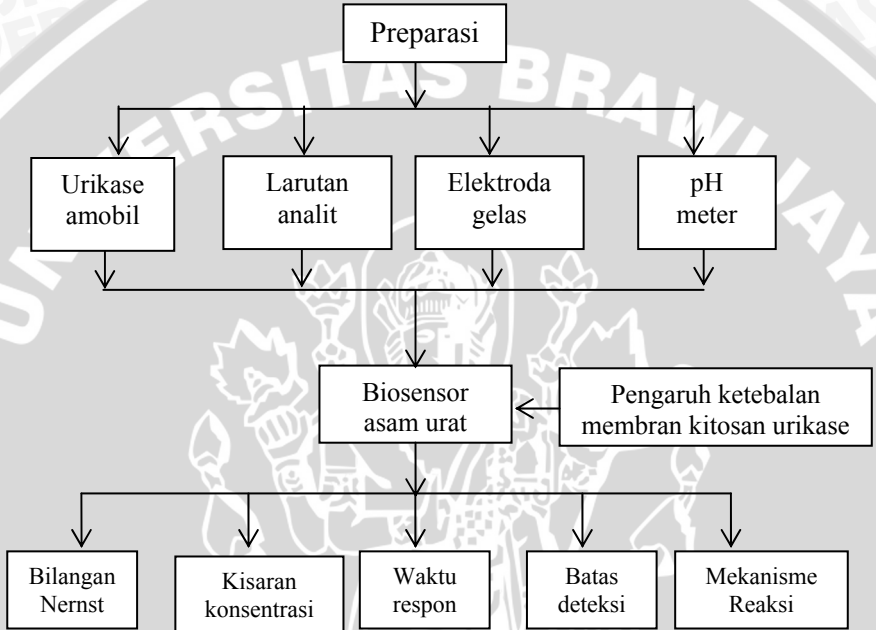
- Rao, G., and Mulchandani, A., 2005, Biosensor Construction, www.jaist.ac.jp, diakses pada tanggal 29 April 2007, hal. 8-10
- Rawn, J.D, 1989, **Biochemistry**, Neil Patterson Publisher California Biological Supply Company, Barlington, North California, hal. 654
- Reid, R.C., Prausnitz, J.M., dan Poling, B.E., 1987, **The Properties of Gases and Liquid**, 2nd ed., McGraw Hill Book, Boston, hal. 1
- Sa'adah, B., 1996, **Karakterisasi Ekstrak Kasar Enzim Urikase Hasil Isolasi Dari Candida utilis**, Skripsi, Jurusan Kimia Universitas Brawijaya, Malang, hal. 22-29, 45
- Skoog, D.A., West, D.M., dan Holler, F.J., 1988, **Analytical Chemistry An Introduction**, 5th ed., Saunders College Publishing, New York, hal. 386-387
- Soepia, R.S., dan Lieshout, G.V., 1978, **Kimia Analisa**, Institut Teknologi Bandung, Bandung, hal. 123-126
- Sundari, 1996, **Amobilisasi Enzim Urikase Dari Candida utilis Dengan Carrier Na-Alginat**, Skripsi, Jurusan Kimia Universitas Brawijaya, Malang, hal. 44
- Smith, J.E., 1995, **Bioteknologi**, 2nd ed., Alih bahasa: dr. Danry Hartono, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta, hal. 76-81
- Suhartono, M.T., 1989, **Enzim dan Bioteknologi**, Pusat Antar Universitas Bioteknologi, IPB, Bogor, hal. 142-150, 180
- Winarno, F.G., 1995, **Enzim Pangan**, Gramedia Pustaka Utama, Jakarta, hal. 66-71
- Wiseman, A., 1985, **Handbook Of Enzyme Biotechnology**, John Wiley and Sons, New York, hal. 128

LAMPIRAN

LAMPIRAN 1

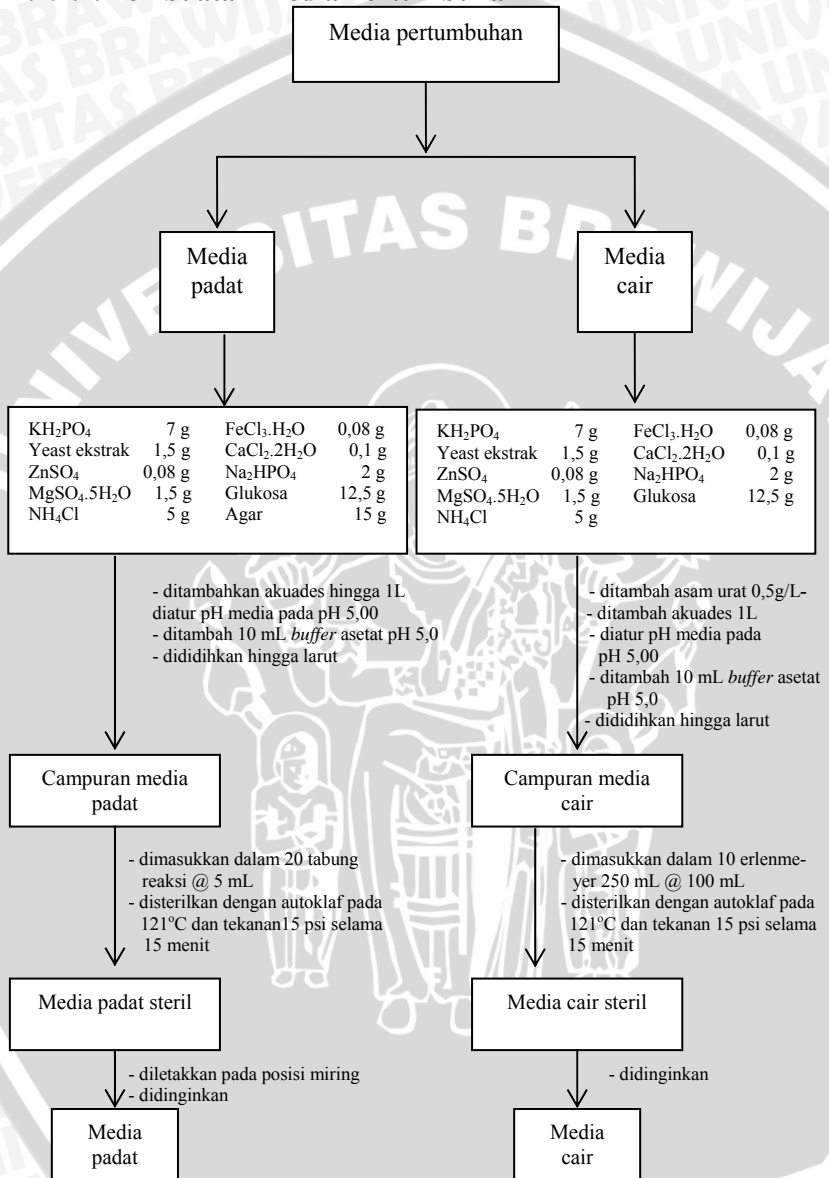
DIAGRAM ALIR PENELITIAN

L.1.1. Diagram Alir Pembuatan Biosensor Asam Urat

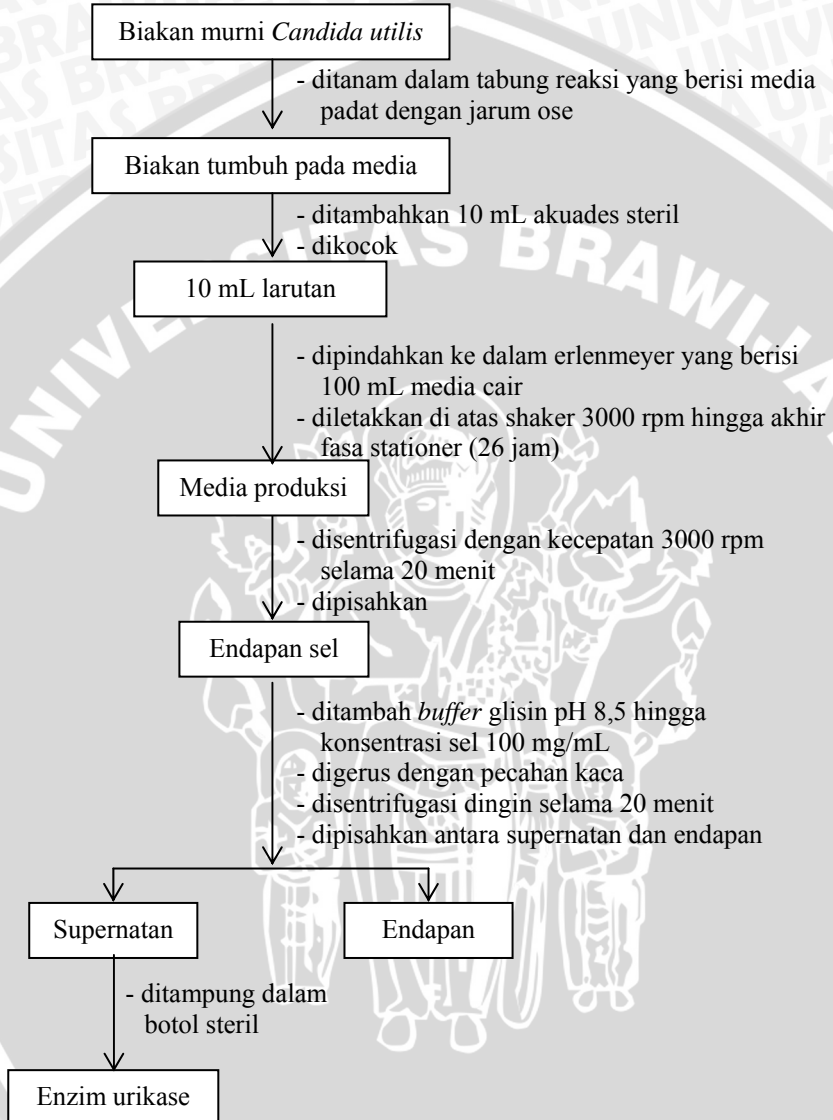


L.1.2. Pembuatan Urikase Amobil

L.1.2.1. Pembuatan Media Pertumbuhan



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



L.1.3. Penentuan Kadar Protein Urikase

L.1.3.1. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Kasein

2 mL larutan kasein 5000 ppm

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

λ_{maks} kasein

L.1.3.2. Penentuan Kurva Baku Kasein

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

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

Kurva baku kasein

L.1.3.3. Penentuan Kadar Protein

2 mL urikase

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

Hasil

L.1.4. Amobilisasi Urikase

Massa kitosan
(0,1g; 0,15 g; 0,2 g; 0,25 g; 0,3g)

- dilarutkan masing-masing variasi massa dengan 10 mL asam asetat 0,8 %
- diaduk dengan stirrer selama 12 jam

Larutan kitosan

- dituang pada lempengan kaca
- diratakan
- diangin-anginkan

Membran

- dicetak bulat dengan diameter 4 cm

Membran bulat

- direndam dalam larutan NaOH 1 % selama 20 menit
- dibilas dengan akuades
- dicelupkan dalam larutan asam asetat pH 4
- dibilas dengan akuades
- direndam dalam larutan urikase selama 24 jam

Membran kitosan

L.1.5. Pengukuran Ketebalan Membran Kitosan

Membran kitosan dengan massa
0,1g; 0,15 g; 0,2 g; 0,25 g; 0,3g

- diukur dengan menggunakan mikrometer sekrup
- dimasukkan masing-masing membran kitosan ke dalam mikrometer sekrup
- dijepit
- dibaca ketebalan membran kitosan yang terukur
- dilakukan pengulangan pengukuran ketebalan masing-masing membran kitosan sebanyak 3 kali

Hasil

L.1.6. Karakteristik Biosensor Asam Urat

Elektroda gelas

- dihubungkan dengan pH meter
- dilakukan kalibrasi dengan larutan *buffer* standar

Urikase amobil

- dibilas dengan akuades
- dilapiskan pada permukaan elektroda gelas
- diikat

Biosensor asam urat

- dikalibrasi dengan larutan *buffer* fosfat pH 9
- diukur potensial sel larutan asam urat baik dengan membran maupun tanpa membran

Data potensial sel

- dibuat grafik hubungan antara $-\log [\text{asam urat}]$ terhadap ΔE_{sel}
- ditentukan bilangan Nernst, kisaran konsentrasi, batas deteksi, dan waktu respon

Hasil

LAMPIRAN 2

PEMBUATAN LARUTAN

L.2.1. Larutan Na_2HPO_4 0,2 M

Untuk membuat larutan Na_2HPO_4 0,2 M sebanyak 500 mL, berat padatan yang diperlukan adalah:

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

Ditimbang 14,2 g padatan Na_2HPO_4 , dilarutkan dengan akuades dalam gelas kimia 100 mL, selanjutnya dituang dalam labu ukur 500 mL dan diencerkan dengan akuades hingga tanda batas.

L.2.2. Larutan NaH_2PO_4 0,2 M

Untuk mendapatkan 500 mL larutan NaH_2PO_4 0,2 M, berat padatan NaH_2PO_4 0,2 M yang harus ditimbang adalah:

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

Ditimbang 12 g padatan NaH_2PO_4 dilarutkan dengan akuades dalam gelas kimia 100 mL, dituang ke dalam labu ukur 500 mL kemudian diencerkan dengan akuades sampai tanda batas.

L.2.3. Larutan *Buffer* Fosfat

Larutan *Buffer* Fosfat 0,2 M pH 9

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

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

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

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

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

$$\log a = 1,79$$

$$a = 61,6595$$

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

$$[\text{NaH}_2\text{PO}_4]$$

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

$$\frac{C_{\text{Na}_2\text{HPO}_4} \times V_{\text{Na}_2\text{HPO}_4}}{V_{\text{Total}}} = 61,6595 \frac{C_{\text{Na}_2\text{HPO}_4} \times V_{\text{Na}_2\text{HPO}_4}}{V_{\text{Total}}}$$

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

$$V_{\text{total}} = 62,6595 V_{\text{Na}_2\text{HPO}_4}$$

- $V_{\text{NaH}_2\text{PO}_4} = 1 / (62,6595) \times 100 \text{ mL} = 1,60 \text{ mL}$
- $V_{\text{Na}_2\text{HPO}_4} = 100 \text{ mL} - 1,6 \text{ mL} = 98,4 \text{ mL}$

Untuk memperoleh larutan *buffer* fosfat dengan pH 9 sebanyak 100 mL dilakukan pencampuran 1,6 mL larutan NaH_2PO_4 0,2 M dengan 98,4 mL larutan Na_2HPO_4 0,2 M dalam gelas kimia 250 mL sambil dilakukan pengadukan dan dengan menggunakan pH meter diatur pH larutan hingga 9.

L.2.4. Larutan Asam Asetat 0,1 M

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

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

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

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

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 0,1 M.

L.2.5. Larutan Asam Asetat 0,1 M pH 4,0

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

L.2.6. Larutan NaOH 1 %

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

L.2.7. Larutan NaOH 0,1 M

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

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

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

L.2.8. Larutan NaOH 1 M

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

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

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

L.2.9. Pembuatan Larutan Asam Urat Berbagai Konsentrasi

L.2.9.1. Larutan Asam Urat 100 ppm

Untuk membuat larutan asam urat 100 ppm sebanyak 1000 mL dapat dilakukan dengan cara ditimbang 0,1 g asam urat dan dimasukkan ke dalam gelas kimia 100 mL. Kemudian ditambahkan tetes demi tetes larutan NaOH 0,1 M. Setelah larut sempurna dipindahkan dalam labu

ukur 100 mL secara kuantitatif dan diencerkan dengan akuades sampai tanda batas.

L.2.9.2. Pembuatan Larutan Asam Urat 25 ppm, 20 ppm, 15 ppm, 10 ppm, dan 5 ppm

Pembuatan larutan asam urat 25 ppm sebanyak 250 mL dilakukan dengan cara dipipet 62,5 mL larutan asam urat 100 ppm dan dimasukkan ke dalam labu ukur 250 mL, kemudian diencerkan hingga tanda batas menggunakan larutan *buffer* fosfat pH 9.

Contoh perhitungan pembuatan larutan asam urat 25 ppm hingga 5 ppm

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

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

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

Volume larutan asam urat 100 ppm yang harus dipipet untuk membuat sederetan larutan asam urat adalah sebagai berikut :

$C_{\text{Asam urat}}$ (ppm)	Volume Asam Urat 100 ppm yang Dipipet (mL)	Diencerkan Menjadi (mL)
25	62,5	250
20	50	250
15	37,5	250
10	25	250
5	12,5	250

L.2.10. Larutan Asam Asetat 0,8 %

Pembuatan larutan CH_3COOH 0,8 % sebanyak 100 mL dilakukan dengan cara dipipet 0,8 mL larutan asam asetat glasial kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL. Setelah itu diencerkan sampai tanda batas sehingga diperoleh larutan asam asetat 0,8 %.

Larutan asam asetat 0,8 % mempunyai pH 4,3; dengan perhitungan sebagai berikut :

$$\begin{aligned}[\text{CH}_3\text{COOH}] &= \frac{10 \times \text{Kadar} \times \text{BJ}}{\text{BM}} \\ &= \frac{10 \times 0,8 \times 8,4 \cdot 10^{-3} \text{ g/L}}{60 \text{ g/mol}} \\ &= 1,12 \cdot 10^{-3} \text{ M} \\ [\text{H}_3\text{O}^+] &= \sqrt{1,75 \cdot 10^{-3} \times 1,12 \cdot 10^{-3} \text{ M}} \\ &= 1,4 \cdot 10^{-4} \text{ M} \\ \text{pH} &= -\log [\text{H}_3\text{O}^+] \\ &= -\log 1,4 \cdot 10^{-4} = 3,8\end{aligned}$$

L.2.11. Larutan Asam Asetat 0,2 M

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

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

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

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

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.2.12. 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.2.13. Larutan Buffer Asetat 0,2 M pH 5,00

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

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

$$= 5 - 4,76 = 0,24$$

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

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

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

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

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

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

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

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

Larutan *buffer* asetat 0,2 M dengan pH 5,0 sebanyak 50 mL dapat dibuat dengan mencampurkan 18,3 mL larutan CH_3COOH 0,2 M dengan 31,7 mL larutan CH_3COONa 0,2 M dalam gelas kimia 100 mL sambil dilakukan pengadukan dan diperiksa pH-nya dengan menggunakan pH meter.

L.2.14. Larutan Glisin 1 M ($\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOH}$)

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

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

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

L.2.15. Larutan *Buffer* Glisin 0,1 M pH 8,5

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

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

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

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

$$3,32 \cdot 10^{-10} p = 4 \cdot 10^{-9}$$

$$p = 12,05 \text{ mL}$$

Untuk membuat larutan *buffer* glisin pH 8,5 dapat dibuat dengan cara dipipet 25 mL larutan glisin 1 M dan

ditambahkan dengan 12,05 mL larutan NaOH 0,1 M dalam gelas kimia 100 mL sambil dilakukan pengadukan dan diperiksa pH-nya dengan menggunakan pH meter.

L.2.16. Pembuatan Reagen Biuret

Reagen biuret dibuat dengan cara menimbang 0,15 g CuSO_4 dan kalium natrium tartrat 0,6 g. Kemudian dilarutkan dengan akuades dalam gelas kimia 100 mL sambil diaduk dengan pengaduk gelas hingga larut semua, ditambah 30 mL NaOH 10 % dan dituangkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan akuades sampai tanda batas.

L.2.17. Larutan Kasein 10000 ppm

Larutan kasein 10000 ppm dapat dibuat dengan cara ditimbang kasein sebanyak 1 g 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 10000 ppm.

L.2.18. Larutan Baku Kasein

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

LAMPIRAN 3

ISOLASI URIKASE DARI *Candida utilis*

L.3.1. Pembuatan Media Padat

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

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

Bahan tersebut ditambah akuades sampai 1000 mL dan pH media diatur 5,00 dengan menambahkan larutan asam asetat 0,2 M dan untuk mempertahankan pH larutan ditambah 10 mL *buffer* asetat pH 5,00 tiap 1000 mL media. Kemudian bahan tersebut dilarutkan dengan cara dididihkan. Larutan dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 mL dan ditutup dengan kapas. Selanjutnya disterilkan dalam autoklaf pada temperatur 121°C, tekanan 15 psi selama 15 menit. Setelah autoklaf dibuka, tabung reaksi diletakkan pada posisi miring dalam keadaan panas.

L.3.2. Pembuatan Media Cair

Media cair untuk pertumbuhan *Candida utilis* mempunyai komposisi sama dengan komposisi media padat, tetapi pada media cair tanpa dilakukan penambahan agar dan perlu ditambahkan asam urat 0,5 g/L sebagai induser. Penambahan asam urat akan meningkatkan produksi urikase pada *Candida utilis*. Bahan-bahan tersebut ditambah akuades 1000 mL dan pH media diatur pada 5,00 dengan menambahkan larutan asam asetat 0,2 M dan untuk mempertahankan pH larutan ditambahkan 10 mL *buffer* asetat pH 5,00 tiap 1000 mL

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

L.3.3. Penanaman Biakan Murni

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

L.3.4. Isolasi Enzim

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

L.3.5. Ekstraksi Urikase

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

L.3.6. Penentuan Kadar Protein

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

5000 ppm. Kemudian dikocok dan diinkubasi pada temperatur 50°C selama 30 menit pada temperatur kamar. Setelah itu diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang maksimum. Sebagai blanko dipipet 2 mL air, ditambahkan 8 mL reagen biuret, dan ditambahkan dengan 2 mL *buffer* glisin pH 8,5 selanjutnya dilakukan perlakuan yang sama seperti diatas. Untuk menentukan konsentrasi protein enzim digunakan kurva standar kasein. Konsentrasi protein enzim ditentukan dengan mengkonversikan absorbansi pada kurva baku kasein.



LAMPIRAN 4

PENENTUAN KONSENTRASI URIKASE

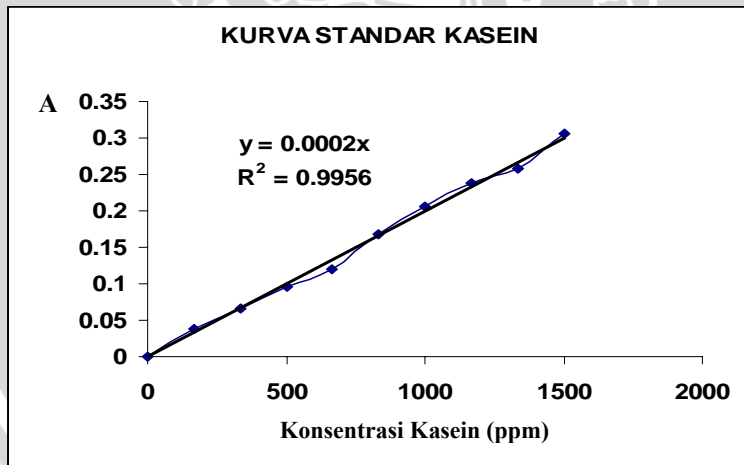
L.4.1. Penentuan λ_{maks} Kasein

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

L.4.2. Kurva Baku Kasein

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

C_{kasein} (ppm)	A (1)	A (2)	A (3)	A (rata-rata)
0	0	0	0	0
166,6	0,042	0,042	0,033	0,039
333,3	0,067	0,063	0,069	0,066
500,0	0,098	0,093	0,100	0,097
666,6	0,123	0,120	0,116	0,120
833,3	0,180	0,174	0,151	0,168
1000,0	0,206	0,196	0,217	0,206
1166,6	0,237	0,241	0,239	0,239
1333,3	0,255	0,266	0,255	0,258
1500,0	0,308	0,320	0,293	0,307



Gambar L.4.1. Kurva Baku Kasein

L.4.3. Penentuan Kadar Protein

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

Diketahui persamaan regresi kasein :

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

Volume enzim yang digunakan untuk penentuan = 2 mL

Volume larutan standar kasein 5000 ppm yang ditambahkan = 2 mL

Volume larutan yang diukur absorbansinya = 12 mL

Konsentrasi kasein yang ditambahkan :

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

$$C_2 = 833,3 \text{ ppm}$$

**Konsentrasi total = konsentrasi protein enzim +
konsentrasi kasein**

Contoh Perhitungan :

Perhitungan kadar protein dengan absorbansi 0,2529 adalah :

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

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

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

Maka konsentrasi enzim = konsentrasi protein total –
konsentrasi kasein yang ditambahkan

$$= 1264,5 \text{ ppm} - 833,3 \text{ ppm}$$

$$= 431,2 \text{ ppm}$$

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

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

$$= 2,586 \text{ mg/mL}$$

Tabel L.4.2. Kadar Protein Urikase

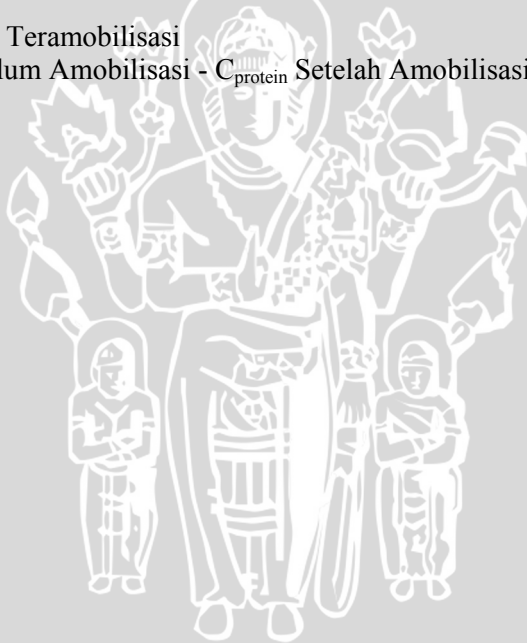
Absorbansi			C _{protein} (mg/mL)			C _{protein rerata (mg/mL)}
A ₁	A ₂	A ₃	1	2	3	
0,2529	0,2548	0,2535	2,587	2,644	2,605	2,612

Tabel L.4.3. Data Kadar Protein Urikase Sebelum, Setelah, dan yang Telah Teramobilkan pada Membran Kitosan

Ketebalan Membran (μm)	A (rata-rata)	Massa Urikase Sebelum Amobilisasi (mg)	Massa Urikase Setelah Amobilisasi (mg)	Massa Urikase Teramobilkan (mg)
8,4	0,2047	13,06	5,71	7,35
10,5	0,1781	13,06	1,72	11,34
11,5	0,1783	13,06	1,75	11,31
13	0,1785	13,06	1,77	11,29
14	0,1799	13,06	1,99	11,07

Massa Urikase Teramobilisasi

$$= (C_{\text{protein}} \text{ Sebelum Amobilisasi} - C_{\text{protein}} \text{ Setelah Amobilisasi}) \times 5 \text{ mL}$$



LAMPIRAN 5

DATA HASIL PENELITIAN

L.5.1. Data Hasil Pengukuran

Tabel L.5.1. Data Hasil Pengukuran Potensial pada Berbagai Ketebalan Membran Kitosan Urikase Amobil

Ketebalan membran = 8,4 μm											
$C_{\text{asam urat}}$ (ppm)	[Asam Urat] (M)	$-\log$ [Asam urat]	Tanpa membran	Dengan membran	ΔE_{net}	Tanpa membran	Dengan membran	ΔE_{net}	Tanpa membran	Dengan membran	ΔE_{net} rata-rata
5	2.97E-05	4.526655	-82	-80	2	-82	-60	2	-89	-82	7
10	5.95E-05	4.225625	-93	-86	7	-74	-71	3	-96	-89	7
15	8.92E-05	4.049533	-94	-88	6	-78	-72	3	-94	-87	7
20	0.000119	3.924595	-91	-87	4	-77	-73	4	-91	-83	8
25	0.000149	3.827685	-89	-86	3	-75	-73	2	-89	-81	8
Ketebalan membran = 10,5 μm											
$C_{\text{asam urat}}$ (ppm)	[Asam Urat] (M)	$-\log$ [Asam urat]	Tanpa membran	Dengan membran	ΔE_{net}	Tanpa membran	Dengan membran	ΔE_{net}	Tanpa membran	Dengan membran	ΔE_{net} rata-rata
5	2.97E-05	4.526655	-92	-67	25	-87	-67	20	-69	-62	7
10	5.95E-05	4.225625	-102	-75	27	-95	-71	24	-78	-66	12
15	8.92E-05	4.049533	-99	-79	20	-94	-77	17	-79	-69	10
20	0.000119	3.924595	-96	-79	17	-95	-81	14	-77	-70	7
25	0.000149	3.827685	-92	-79	13	-91	-81	10	-74	-69	5
Ketebalan membran = 11,5 μm											
$C_{\text{asam urat}}$ (ppm)	[Asam Urat] (M)	$-\log$ [Asam urat]	Tanpa membran	Dengan membran	ΔE_{net}	Tanpa membran	Dengan membran	ΔE_{net}	Tanpa membran	Dengan membran	ΔE_{net} rata-rata
5	2.97E-05	4.526655	-96	-81	15	-95	-79	16	-79	-66	13
10	5.95E-05	4.225625	-102	-85	17	-103	-83	20	-87	-68	19
15	8.92E-05	4.049533	-100	-86	14	-99	-84	15	-85	-70	15
20	0.000119	3.924595	-95	-87	8	-98	-87	11	-83	-73	10
25	0.000149	3.827685	-92	-86	6	-93	-84	9	-80	-72	8

Ketebalan membran = 13 μm

Casam urat (ppm)	[Asam Urat] (M)	$-\log$ [Asam urat]	Tanpa membran	Dengan membran	ΔE_{-u}	Tanpa membran	Dengan membran	ΔE_{-u}	Tanpa membran	Dengan membran	ΔE_{-u}	ΔE_{-u} rata-rata
5	2.97E-05	4.526655	-96	-63	33	-84	-67	17	-71	-51	20	23.33333
10	5.95E-05	4.225625	-105	-71	34	-92	-68	24	-78	-52	26	28
15	8.92E-05	4.049533	-102	-74	28	-98	-77	21	-82	-58	24	24.33333
20	0.000119	3.924595	-98	-75	23	-97	-78	19	-81	-60	21	21
25	0.000149	3.827685	-95	-76	19	-92	-78	14	-81	-63	18	17

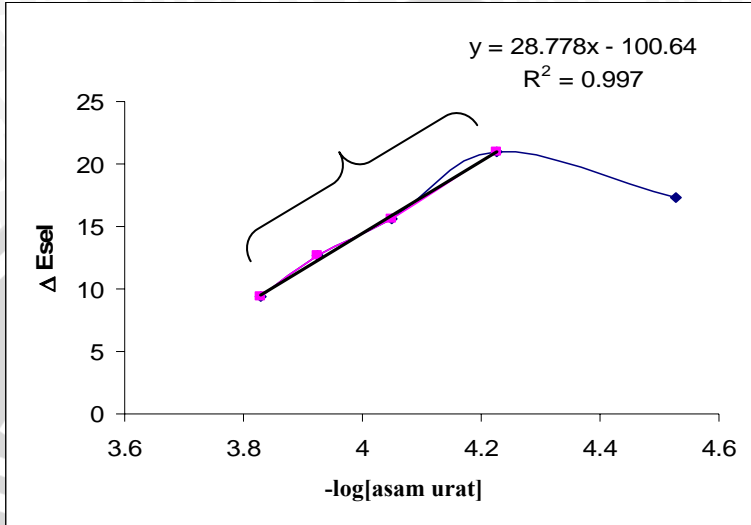
Ketebalan membran = 14 μm

Casam urat (ppm)	[Asam Urat] (M)	$-\log$ [Asam urat]	Tanpa membran	Dengan membran	ΔE_{-u}	Tanpa membran	Dengan membran	ΔE_{-u}	Tanpa membran	Dengan membran	ΔE_{-u}	ΔE_{-u} rata-rata
5	2.97E-05	4.526655	-95	-48	47	-87	-57	30	-78	-58	20	32.33333
10	5.95E-05	4.225625	-105	-55	50	-90	-58	32	-80	-60	20	34
15	8.92E-05	4.049533	-101	-59	42	-94	-63	31	-85	-64	21	31.33333
20	0.000119	3.924595	-97	-64	33	-92	-65	27	-84	-66	18	26
25	0.000149	3.827685	-93	-66	27	-90	-68	22	-82	-68	14	21

Tabel L.5.2. Data Hasil Pengukuran Waktu Respon

Waktu (s)	10ppm			15ppm			20ppm			25ppm		
	Tanpa Urikase (mV)	Dengan Urikase (mV)	ΔE_{val} (mV)	Tanpa Urikase (mV)	Dengan Urikase (mV)	ΔE_{val} (mV)	Tanpa Urikase (mV)	Dengan Urikase (mV)	ΔE_{val} (mV)	Tanpa Urikase (mV)	Dengan Urikase (mV)	ΔE_{val} (mV)
0	-49	-31	18	-50	-39	11	-59	-44	15	-53	-48	5
30	-60	-49	11	-62	-53	9	-70	-56	14	-62	-58	4
60	-63	-52	11	-64	-55	9	-72	-59	13	-64	-61	3
90	-63	-53	10	-65	-58	9	-73	-60	13	-65	-62	3
120	-63	-54	9	-65	-57	8	-73	-61	12	-65	-62	3
150	-63	-54	9	-65	-57	8	-73	-61	12	-65	-62	3
180	-63	-55	8	-65	-57	8	-73	-62	11	-65	-62	3
210	-63	-55	8	-65	-57	8	-73	-63	10	-65	-62	3
240	-63	-55	8	-65	-58	7	-73	-63	10	-65	-62	3
270	-63	-56	7	-65	-58	7	-73	-63	10	-65	-62	3
300	-63	-56	7	-65	-58	7	-73	-63	10	-65	-62	3
330	-63	-56	7	-65	-58	7	-73	-63	10	-65	-62	3
360	-63	-56	7	-65	-58	7	-73	-63	10	-65	-62	3

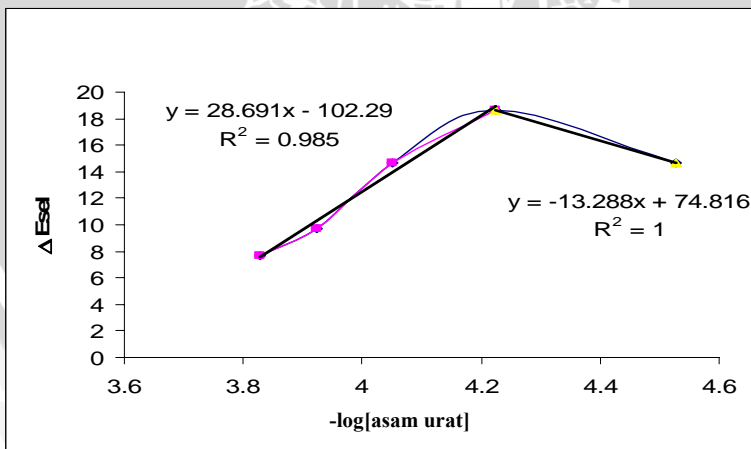
L.5.1. Contoh Penentuan Parameter Kinerja Biosensor



Berdasarkan kurva hubungan antara $-\log [\text{asam urat}]$ dan ΔE_{sel} dapat diperoleh persamaan garis linier yaitu $y = ax + b$. Nilai bilangan Nernst ditunjukkan oleh a yaitu sebesar 28,8 mV/dekade.

Kisaran konsentrasi diperoleh dari kurva yang membentuk garis linier yaitu pada konsentrasi 10 ppm hingga 25 ppm.

Batas Deteksi



$$28,691x - 102,29 = -13,288x + 74,816$$

$$\begin{aligned}
 28,691x + 13,288x &= 74,816 + 102,29 \\
 x &= 4,2189 \\
 -\log q &= 4,2189 \\
 q &= 6,05 \cdot 10^{-5} \text{ M} \\
 &= 10,15 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

Tabel L.5.3. Data Asam Urat Maksimum yang Dapat Diubah

Ketebalan Membran Kitosan (μm)	Massa Urikase Teramobilisasi (mg)	Asam Urat Maksimum yang Dapat Diubah (mg)
8,4	7,35	0,741
10,5	11,34	1,144
11,5	11,31	1,141
13	11,29	1,139
14	11,07	1,117

Contoh Perhitungan

Untuk konsentrasi urikase amobil 1,47 mg/mL

Aktivitas urikase = 0,3126 unit ($\mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$)

Aktivitas spesifik = 0,3126 / 2,612 mg/mL

= 0,12 $\mu\text{mol/mg}\cdot\text{menit}$

Jumlah urikase dalam 5 mL selama 5 menit

= 1,47 mg/mL x 5 mL

= 7,35 mg

Asam urat yang dapat diubah

= 0,12 $\mu\text{mol/mg}\cdot\text{menit}$ x 7,35 mg x 5 menit x 168,122 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}/1000$

= 0,74 mg

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

Massa Kitosan (g)	Pengukuran Ke-1 (mm)	Pengukuran Ke-2 (mm)	Pengukuran Ke-3 (mm)	Rata-rata (mm)	Rata-rata (μm)
0,1	0,0084	0,0084	0,0084	0,0084	8,4
0,15	0,0107	0,0104	0,0104	0,0105	10,5
0,2	0,0116	0,0114	0,0115	0,0115	11,5
0,25	0,0135	0,013	0,0125	0,013	13
0,3	0,014	0,013	0,015	0,014	14

