

**PENGARUH pH LARUTAN ASAM URAT TERHADAP
KINERJA BIOSENSOR POTENSIOMETRI ASAM URAT
DENGAN MENGGUNAKAN MEMBRAN NATA *DE COCO*
SEBAGAI MEDIA AMOBILISASI ENZIM**

SKRIPSI

oleh :

**AYU DANA KHISMIYANTI
0710920045-92**



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2011**

**PENGARUH pH LARUTAN ASAM URAT TERHADAP
KINERJA BIOSENSOR POTENSIOMETRI ASAM URAT
DENGAN MENGGUNAKAN MEMBRAN NATA *DE COCO*
SEBAGAI MEDIA AMOBILISASI ENZIM**

SKRIPSI

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

oleh :

AYU DANA KHISMIYANTI

0710920045-92



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2011**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**PENGARUH pH LARUTAN ASAM URAT TERHADAP
KINERJA BIOSENSOR POTENSIOMETRI ASAM URAT
DENGAN MENGGUNAKAN MEMBRAN *NATA DE COCO*
SEBAGAI MEDIA AMOBILISASI ENZIM**

oleh :

AYU DANA KHISMIYANTI

0710920045-92

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji

Pada tanggal.....

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

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. Ani Mulyasuryani, MS

NIP. 19630628 199103 2 001

Drs. Sutrisno, M.Si

NIP. 19620318 199002 1 001

Mengetahui,

Ketua Jurusan Kimia

Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Dr. Sasangka Prasetyawan, MS

NIP. 196304041987011001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Ayu Dana Khismiyanti

NIM : 0710920045-92

Jurusan : Kimia

Penulis skripsi berjudul :

PENGARUH pH LARUTAN ASAM URAT TERHADAP KINERJA BIOSENSOR POTENSIOMETRI ASAM URAT DENGAN MENGGUNAKAN MEMBRAN NATA *DE COCO* SEBAGAI MEDIA AMOBILISASI ENZIM

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 risiko yang akan saya terima. Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 15 November 2011

Yang menyatakan,

Ayu Dana Khismiyanti

NIM. 0710920045-92

PENGARUH pH LARUTAN ASAM URAT TERHADAP KINERJA BIOSENSOR POTENSIOMETRI ASAM URAT DENGAN MENGGUNAKAN MEMBRAN NATA *DE COCO* SEBAGAI MEDIA AMOBILISASI ENZIM

ABSTRAK

Biosensor asam urat dapat dibuat dengan melapisi permukaan elektroda gelas dengan urikase amobil dalam membran *nata de coco*. Nata de coco adalah hasil proses fermentasi air kelapa menggunakan *Acetobacter xylinum* dengan kandungan utama adalah selulosa. Membran *nata de coco* dipilih karena memiliki banyak pori sehingga memudahkan transfer analit menuju transduser. Kinerja biosensor potensiometri asam urat dipengaruhi oleh pH, karena aktivitas urikase bergantung pada pH. Oleh karena itu, pada penelitian ini dipelajari pengaruh pH larutan terhadap kinerja biosensor potensiometri asam urat. Kinerja biosensor potensiometri asam urat yang telah dibuat dipelajari pada kisaran pH 7,0 hingga 9,5 dan konsentrasi asam urat 0 hingga 35 ppm. Hasil penelitian menunjukkan kinerja biosensor potensiometri asam urat dipengaruhi oleh pH larutan. Kinerja biosensor terbaik dihasilkan pada pH 9,0. Pada kondisi tersebut biosensor potensiometri asam urat menunjukkan kepekaan sebesar 31,52 mV/dekade pada kisaran konsentrasi pengukuran 21 - 30 ppm, batas deteksi 19,7 ppm, waktu respon 390 detik, dan lama pemakaian biosensor asam urat dapat digunakan untuk satu kali pengukuran.

THE INFLUENCE OF pH ON URIC ACID POTENTIOMETRIC BIOSENSOR USING NATA DE COCO MEMBRANE FOR IMMOBILIZED ENZIM

ABSTRACT

Uric acid biosensor could be made by coating the glass electrode with immobilized uricase in *nata de coco* membrane. *Nata de coco* is the fermentation product of coconut water using *Acetobacter xylinum* with the main content is cellulose. *Nata de coco* membrane was chosen because it has many pores that facilitate the transfer of analyte to transducer. The performance of uric acid potentiometric biosensor was affected by pH, because uricase activity was dependent on pH. Therefore, this research was studied about the effect of pH solution to the performance of uric acid potentiometric biosensor. The performance of uric acid biosensor was studied at pH range 7,0 to 9,5 and within 0 - 35 ppm of uric acid concentration. The research result showed that the performance of uric acid potentiometric biosensor was affected by pH of the solution. The best performance of biosensor was found at pH 9,0. In that condition, uric acid potentiometric biosensor showed sensitivity 31,52 mV/decade at 21 - 30 ppm of uric acid concentration range, 19,7 ppm of detection limit, response time 390 seconds, and life time of uric acid biosensor can be used for once time measurements.

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan segala rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **Pengaruh pH Larutan Asam Urat terhadap Kinerja Biosensor Potensiometri Asam Urat dengan Menggunakan Membran *Nata De Coco***. Maksud dan tujuan penulisan skripsi ini adalah sebagai syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Ilmu Kimia.

Penulisan skripsi ini tidak lepas dari dukungan dan bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Dr. Ani Mulyasuryani, MS, selaku dosen Pembimbing I dan Drs. Sutrisno, M.S, selaku dosen pembimbing II yang telah membimbing penulis hingga terselesainya penulisan skripsi ini.
2. M. Farid Rahman S.Si., M.Si., Ir. Bambang Ismuyanto, MS, Darjito, S.Si., M.Si., dan Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS sebagai dosen penguji.
3. Ir. Bambang Ismuyanto, M.S, selaku dosen Penasehat Akademik yang telah memberikan banyak nasehat dan pengarahan selama ini.
4. Dr. Sasangka Prasetyawan, MS, selaku Ketua Jurusan Kimia Universitas Brawijaya.
5. Seluruh dosen dan karyawan Jurusan Kimia Universitas Brawijaya atas segala ilmu dan bantuan yang diberikan.
6. Kedua orang tua dan ketiga saudaraku serta seluruh keluargaku yang selalu mendoakan dan memberi dukungan baik spirituil maupun materil.
7. Teman-teman di Jurusan Kimia dan segenap pihak yang telah memberikan dorongan dan bantuan dalam menyelesaikan skripsi ini.

Akhir kata penulis hanya berharap bahwa skripsi ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan dan memberikan gagasan baru untuk perkembangan biosensor asam urat di masa mendatang.

Malang, Oktober 2011

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB I PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	3
1.3. Batasan Masalah	3
1.4. Tujuan Penelitian	3
1.5. Manfaat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Biosensor	4
2.1.1 Transduser.....	4
2.1.2 Bioreseptor.....	6
2.1.2.1. Enzim urikase.....	13
2.2 Biosensor Potensiometri Asam Urat	15
2.3 Kinerja Biosensor	20
2.3.1. Penentuan Kisaran Konsentrasi dan Batas Deteksi	20
2.3.2. Penentuan Kepekaan	20
2.3.3. Penentuan Waktu Respon.....	21
2.3.4. Penentuan Efisiensi	21
2.4 Hipotesis.....	21
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian.....	22
3.2. Bahan dan Alat Penelitian	22
3.2.1. Bahan penelitian.....	22
3.2.2. Alat penelitian	22
3.3. Tahapan Penelitian.....	22
3.4. Cara Kerja.....	23

3.4.1. Preparasi alat dan bahan.....	23
3.4.2. Amobilisasi urikase dalam membran <i>nata de coco</i>	23
3.4.3. Perancangan biosensor asam urat.....	23
3.4.4. Pengukuran potensial sel.....	23
3.4.5. Penentuan bilangan nersnt biosensor asam urat.....	23
3.4.6. Penentuan kisaran konsentrasi dan batas deteksi biosensor asam urat.....	24
3.4.7. Penentuan waktu respon biosensor asam urat.....	24
3.4.8. Penentuan lama pemakaian biosensor asam urat.....	24
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1. Pengaruh pH terhadap Kinerja Biosensor Potensiometri.....	25
4.2. Karakterisasi Biosensor Potensiometri Asam Urat.....	28
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1. Kesimpulan.....	33
5.2. Saran.....	33
DAFTAR PUSTAKA	34
LAMPIRAN	38



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. Biosensor Potensiometri.....	5
Gambar 2.2. Enzim yang terikat secara adsorpsi fisik	10
Gambar 2.3. Enzim yang terikat secara adsorpsi kimia	11
Gambar 2.4. Mekanisme deteksi asam urat oleh biosensor asam urat	16
Gambar 2.5. Reaksi oksidasi asam urat oleh enzim urikase	17
Gambar 4.1. Kurva Bilangan Nerst pada berbagai pH.....	28
Gambar 4.2. Kurva Bilangan Nernst dan Batas Deteksi	29
Gambar 4.3. Kurva hubungan Esel terhadap waktu.....	31
Gambar L.3.1. Kurva Baku hubungan antara konsentrasi kasein (ppm) dan absorbansi (A)	49
Gambar L.4.1. Kurva hubungan log [asam urat] dengan E sel pada konsentrasi asam urat 15-30ppm	51
Gambar L.5.1. Kurva hubungan [asam urat] dengan Esel pada konsentrasi 1-35 ppm pH 7,0.....	53
Gambar L.5.2. Kurva hubungan [asam urat] dengan Esel pada konsentrasi 1-35 ppm pH 7,5.....	53
Gambar L.5.3. Kurva hubungan [asam urat] dengan Esel pada konsentrasi 1-35 ppm pH 8,0.....	54
Gambar L.5.4. Kurva hubungan [asam urat] dengan Esel pada konsentrasi 20-30 ppm pH 8,5.....	54
Gambar L.5.5. Kurva hubungan [asam urat] dengan Esel pada konsentrasi 20-30 ppm pH 9,0.....	55
Gambar L.5.6. Kurva hubungan [asam urat] dengan Esel pada konsentrasi 5-15 ppm pH 9,5.....	55

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1. Harga potensial sel pada pH 7,0-9,5 dengan Konsentrasi Asam Urat 0-35 ppm.....	25
Tabel 4.2. Hubungan pH, bilangan nernst dan kisaran konsentrasi	26
Tabel 4.3. Hubungan kali pengukuran dan bilangan nernst.....	31
Tabel L.1.1. Komposisi volume pada pengenceran larutan kasein 10000 ppm	40
Tabel L.1.2. Komposisi volume H ₃ PO ₄ dan NaOH.....	41
Tabel L.1.3. Komposisi asam urat untuk pengenceran.....	42
Tabel L.1.4. Komposisi Volume pada Pengenceran Larutan NaHCO ₃ 100 ppm.....	43
Tabel L.3.1. Data absorbansi kasein pada berbagai panjang gelombang	48
Tabel L.3.2. Absorbansi kasein pada 543,0 nm.....	48
Tabel L.6.1. Data hasil pengukuran potensial sel pada pH 7,0-8,0	56
Tabel L.6.2. Data hasil pengukuran potensial sel pada pH 8,5-9,5	57
Tabel L.6.3. Data Hasil Pengukuran Waktu Respon	58
Tabel L.6.4. Data Hasil Pengukuran Dua Kali Pengulangan Lama Pemakaian	59

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Pembuatan larutan.....	38
Lampiran 2. Isolasi enzim urikase dari <i>Candida</i>	44
Lampiran 3. Penentuan kadar protein enzim	48
Lampiran 4. Penentuan nilangan Nernst, batas deteksi dan kisaran konsentrasi	51
Lampiran 5. Penentuan bikangan Nersnt berbagai macam pH.....	53
Lampiran 6. Data Hasil Pengukuran.....	56



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Asam urat ($C_5H_4N_4O_3$) merupakan produk akhir dari proses metabolisme basa purin dalam tubuh manusia (Schrenkhammer, 2008). Kadar asam urat normal pada pria berkisar antara 3,5 – 7 mg/dL dan pada perempuan berkisar antara 2,6 – 6 mg/dL. Pengendalian asam urat didalam tubuh sangat penting karena jika melebihi batas normal dapat menyebabkan penyakit seperti encok, Lesh-Nyhan, gagal ginjal, hyperuricaemia dan gangguan fisiologis (Schrenkhammer, 2008). Oleh karena itu perlu dibuat alat analitik seperti biosensor asam urat untuk mendeteksi kadar asam urat.

Menurut IUPAC, biosensor adalah suatu alat ukur yang mampu memberikan informasi analitik baik secara kuantitatif maupun semi kuantitatif. Pada dasarnya biosensor terdiri dari tiga komponen yaitu komponen biologi (bioreseptor), komponen transduser dan elemen detektor. Bioreseptor merupakan molekul yang dapat bereaksi dengan analit secara selektif menghasilkan suatu molekul yang dapat dikenali oleh transduser. Bioreseptor yang sering digunakan dalam komponen biosensor adalah enzim, sel bakteri, jaringan organisme tingkat tinggi dan antigen-antibodi. Transduser adalah bagian dari biosensor yang dapat mengubah suatu perubahan elektrokimia menjadi suatu sinyal listrik terukur (Hitt, 2005). Berdasarkan penggunaan transduser, biosensor dapat dibedakan dalam beberapa jenis yaitu biosensor optic, biosensor termal dan biosensor elektrokimia. Biosensor elektrokimia terdiri atas biosensor amperometri, potensiometri, dan konduktometri (Vermereen, 2008). (Vermereen, 2008). Transduser potensiometri didasarkan pada pengukuran beda potensial yang disebabkan karena adanya perubahan jumlah hasil reaksi enzimatis. Adanya hasil reaksi enzimatis ini dapat mempengaruhi potensialnya (Chaplin, 2004).

Biosensor asam urat dirancang atas dasar reaksi oksidasi asam urat yang dikatalisis oleh urikase menghasilkan allantoin, H_2O_2 dan CO_2 . Prinsip kerja biosensor potensiometri asam urat yaitu asam urat akan dioksidasi oleh urikase yang telah diamobilisasi dalam membran menghasilkan CO_2 . Jumlah gas CO_2 yang dihasilkan bereaksi dengan air membentuk H_2CO_3 , dan terurai menjadi HCO_3^- dan H_3O^+ . Keberadaan ion H_3O^+ ini yang akan menyebabkan

perubahan pH larutan. Beberapa penelitian biosensor asam urat yang telah dikembangkan yaitu secara amperometri menggunakan urikase yang diamobilkan dalam lapisan polianilin-polipirol (pany-ppy) dimana deteksinya berdasarkan pengukuran arus yang dihasilkan oleh oksidasi gas H_2O_2 pada potensial 0,4 V pada pH 9,0 (Arslan, 2008). Penelitian yang dilakukan Liao (2006), yaitu biosensor potensiometri asam urat dimana urikase diamobilkan dalam 3-glisidiloksipropiltrimetoksilan (GPTS). Penentuan asam urat dapat dicapai dari reduksi H_2O_2 pada pH 7,5. Metode ini mempunyai kisaran konsentrasi antara 2 mg/dL – 7 mg/dL dan batas deteksi 3,4 mg/dL. Telah dikembangkan pula biosensor asam urat menggunakan membran kitosan sebagai media amobilisasi enzim urikase. Biosensor tersebut memiliki kinerja yang cukup baik pada pH 9,0 (Setyawati, dkk., 2008; Krisna, dkk., 2008).

Pada biosensor asam urat ini digunakan enzim urikase dimana urikase bebas hasil isolasi *Candida utilis* memiliki aktivitas optimum pada pH 8,5 (Jiangou, 1994). Pada keadaan teramobilisasi pada membran kitosan, urikase memiliki aktivitas optimum pada pH 9,0 (Setyawati, dkk., 2008; Krisna, dkk., 2008), pada membran ZnO nanorods memiliki aktivitas pada pH 6,9 (Zhang, et al., 2004), sedangkan pada penelitian Liao (2006) aktivitas urikase yang diamobilisasi dalam membran GPTS memiliki aktivitas maksimum pada pH 7,5. Dari beberapa data hasil penelitian tersebut, dapat diketahui bahwa aktivitas maksimum urikase dalam media tertentu seperti kitosan maupun GPTS akan memiliki pH optimum yang berbeda, sehingga dapat berpengaruh terhadap kinerja biosensor.

Salah satu media amobilisasi urikase yang dapat dimanfaatkan pada biosensor asam urat adalah *nata de coco* karena *nata de coco* memiliki kemurnian tinggi, derajat kristalinitas tinggi, memiliki kerapatan $300 - 900 \text{ kg/m}^3$ dan memiliki kekuatan tarik yang tinggi. Selain itu *nata de coco* memiliki banyak pori sehingga memudahkan transfer analit menuju transduser, serta mudah dibuat dengan biaya yang ekonomis (Piluharto, 2003). Pada penelitian ini, digunakan *nata de coco* sebagai media amobilisasi urikase yang mana pH optimum urikase tersebut belum diketahui, sehingga perlu dipelajari pengaruh pH larutan asam urat terhadap aktivitas urikase yang diamobilkan dalam membran *nata de coco* untuk memperoleh kinerja biosensor potensiometri asam urat yang optimum.

1.2. Perumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah :

1. Bagaimana pengaruh pH larutan asam urat terhadap kinerja biosensor potensiometri asam urat dengan menggunakan membran *nata de coco* sebagai media amobilisasi enzim urikase ?
2. Bagaimana karakter biosensor potensiometri asam urat dengan menggunakan membran *nata de coco* yang meliputi harga bilangan Nernst, kisaran konsentrasi, batas deteksi, dan waktu respon ?

1.3. Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah :

1. Parameter kinerja biosensor potensiometri asam urat dengan menggunakan membran *nata de coco* didasarkan pada : bilangan Nernst, kisaran konsentrasi, batas deteksi, dan waktu respon
2. Urikase yang digunakan adalah hasil isolasi dari *Candida utilis*

1.4. Tujuan Penelitian :

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mempelajari pengaruh pH larutan asam urat terhadap kinerja biosensor potensiometri asam urat dengan menggunakan membran *nata de coco* sebagai media amobilisasi urikase.
2. Mengetahui karakter biosensor potensiometri asam urat dengan menggunakan membran *nata de coco* yang meliputi harga bilangan Nernst, kisaran konsentrasi, batas deteksi, dan waktu respon ?

1.5. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pH optimum larutan asam urat pada penggunaan membran *nata de coco* sebagai media amobilisasi enzim urikase terhadap karakter biosensor potensiometri asam urat yang meliputi harga bilangan Nernst, kisaran konsentrasi, batas deteksi, dan waktu respon.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Biosensor

Biosensor adalah peralatan analitik yang menggunakan molekul biologi (bioreseptor) seperti enzim, antibody, jaringan sel, dan mikroba untuk mendeteksi suatu zat kimia tertentu dengan menggunakan transduser elektrokimia. Biosensor tersusun atas 3 bagian, yaitu bioreseptor, komponen transduser, dan elemen detektor (Chaplin, 2004 ; Hitt, 2005). Biosensor elektrokimia yaitu suatu reaksi kimia yang melibatkan atau menghasilkan suatu ion atau elektron yang akan mengubah sifat elektrik dari larutan. Biosensor jenis ini dapat diklasifikasikan menjadi tiga, yaitu biosensor amperometri, konduktometri dan potensiometri. Ketiga jenis biosensor ini memiliki karakter yang berbeda dan dijelaskan sebagai berikut (Chauvan, dkk., 2004 dan Mohanty, 2001) :

- a. Jenis amperometri didasarkan pada perubahan arus yang dihasilkan dari reaksi enzimatik yang dioksidasi atau direduksi pada permukaan elektroda kerja (katoda atau anoda) sehingga terjadi peningkatan arus (Chaplin, 2004).
- b. Jenis konduktometri mendeteksi suatu perubahan konduktivitas diantara dua elektroda (katoda dan anoda) yang dihasilkan dari reaksi enzimatik (Hitt, 2005).
- c. Jenis potensiometri didasarkan pada pengukuran beda potensial yang disebabkan oleh adanya perubahan jumlah hasil reaksi enzimatik (Chaplin, 2004).

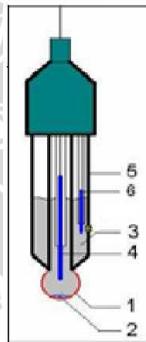
2.1.1. Transduser

Transduser merupakan bagian dari biosensor yang terletak diantara elemen biologis dan elemen detektor yang dapat membaca suatu perubahan fisika maupun kimia dan mengubahnya menjadi sinyal elektrik yang terukur. Ada beberapa jenis transduser yang sering digunakan yaitu amperometri, konduktometri, potensiometri, optik dan termal (Hitt, 2005). Biosensor jenis potensiometri mengukur suatu perubahan potensial oksidasi atau reduksi dari reaksi elektrokimia. Prinsipnya adalah saat elektroda yang terhubung dengan bioreseptor kontak dengan analit, akan terjadi perubahan potensial. Perubahan potensial ini terjadi karena adanya reaksi

enzimatis yang menyebabkan perubahan aktivitas ion analit. Parameter yang terukur adalah potensial sel larutan berdasarkan persamaan Nernst (Mohanty, 2001). Elektroda selektif ion digunakan sebagai transduser pada biosensor potensiometri. Tiga jenis elektroda selektif ion yang digunakan adalah (Chaplin, 2004) :

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

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



Gambar 2.1. Biosensor Potensiometri

Keterangan Gambar 2.1 :

Bagian dari biosensor potensiometri adalah:

1. Bioreseptor, yang diamobilisasi pada suatu membran.
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.

2.1.2. Bioreseptor

Bioreseptor adalah molekul biologi yang dapat bereaksi dengan analit secara selektif (Hitt, 2005). Molekul biologi yang dapat digunakan sebagai bioreseptor dapat digolongkan menjadi 4 golongan utama, yaitu sel bakteri, jaringan tingkat tinggi, antibodi dan enzim. Enzim merupakan bioreseptor yang paling luas penggunaannya. Dibandingkan bioreseptor yang lain, enzim mempunyai kelebihan karena sifat selektifitas dan sensitivitas yang dimilikinya. Selain itu, enzim merupakan molekul protein besar yang berperan sebagai katalis dalam reaksi kimia (Mohanty, 2001; Wang, 2006).

Kondisi optimal reaksi enzimatik berhubungan dengan beberapa faktor yang diantaranya adalah sebagai berikut (Rogers and Gibon, 2009) :

1. Suhu

Aktivitas enzim dapat meningkat seiring dengan kenaikan suhu. Hal ini dipengaruhi oleh kenaikan energi kinetik enzim yang berbanding lurus dengan kenaikan suhu sehingga dapat mempercepat gerak enzim dan substrat untuk bereaksi. Enzim tidak dapat bekerja optimal apabila suhu lingkungan terlalu rendah atau terlalu tinggi yang dapat menyebabkan terjadinya denaturasi enzim sehingga menurunkan kecepatan reaksi.

2. pH (Tingkat Keasaman)

Setiap enzim bekerja pada pH optimal yang berbeda. Perubahan pH yang tidak sesuai akan mengubah konformasi enzim sehingga enzim tidak bekerja secara aktif. Bila aktivitas enzim diukur pada pH yang berlainan, maka sebagian besar enzim akan menunjukkan aktivitas optimum antara pH 5,0 - 9,0. Hal ini disebabkan pada pH rendah atau tinggi, enzim akan mengalami denaturasi dan enzim maupun substrat dapat mengalami perubahan muatan listrik dengan akibat perubahan aktivitas enzim.

Misalnya suatu reaksi enzim dapat berjalan bila enzim tadi bermuatan negatif (E^-) dan substratnya bermuatan positif (SH^+):



Pada pH rendah E^- akan bereaksi dengan H^+ menjadi enzim yang tidak bermuatan.



Demikian pula pada pH tinggi, SH^+ yang dapat bereaksi dengan E^- , maka pada pH yang ekstrem rendah atau tinggi, konsentrasi efektif SH^+ dan E^- akan berkurang, karena itu kecepatan reaksinya juga berkurang.

3. Aktivator dan Inhibitor

Aktivator adalah zat yang dapat mengaktifkan dan menggiatkan kerja enzim. Inhibitor adalah zat yang dapat menghambat kerja enzim. Inhibitor dapat membentuk kompleks dengan enzim baik pada sisi aktif enzim maupun bagian lain dari sisi aktif enzim. Terbentuknya kompleks enzim inhibitor akan menurunkan aktivitas enzim terhadap substratnya.

4. Pengaruh Konsentrasi Enzim

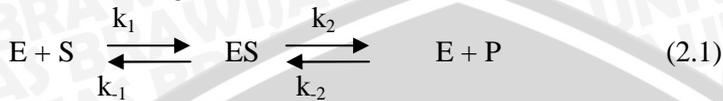
Kecepatan reaksi enzim (v) berbanding lurus dengan konsentrasi enzim (E). Makin besar jumlah enzim maka makin cepat reaksinya. Dalam reaksinya E akan mengadakan ikatan dengan substrat S dan membentuk kompleks enzim-substrat, ES . ES ini akan dipecah menjadi hasil reaksi P dan enzim bebas E . Makin banyak E terbentuk, makin cepat reaksi ini berlangsung. Hal ini terjadi sampai batas tertentu.

5. Pengaruh Konsentrasi Substrat

Kecepatan reaksi yang dikatalisis oleh enzim sangat dipengaruhi oleh konsentrasi substrat. Pada konsentrasi substrat yang sangat rendah, kecepatan reaksi yang dikatalisis enzim juga sangat rendah. Sebaliknya, kecepatan reaksi akan meningkat dengan meningkatnya konsentrasi substrat sampai tercapai titik tertentu, yaitu titik batas kecepatan reaksi maksimum.

Reaksi enzimatik ditunjukkan pada persamaan (2.1), enzim ditandai dengan E , substrat S , produk P , dan kompleks enzim-

substrat ES. Persamaan reaksi enzimatik dapat dituliskan sebagai berikut (Wang, 2006) :



Enzim E pertama kali bereaksi dengan substrat S untuk membentuk suatu kompleks enzim substrat ES, yang pada langkah kedua menghasilkan enzim dan produk P. Kedua reaksi dianggap reversible, dan empat kecepatan elementer konstan disebut k_1 , k_2 , k_{-1} , dan k_{-2} .

Bioaktif yang digunakan dalam suatu biosensor yang berupa enzim diamobilisasi pada suatu permukaan transduser. Amobilisasi enzim merupakan proses pengikatan suatu enzim ke suatu matriks/media amobilisasi secara kimia atau fisika (Eggins, 2002). Matriks pendukung merupakan suatu polimer yang digunakan untuk mengikat enzim. Matriks tersebut bisa berupa membran tertentu untuk menjaga aktivitas katalis enzim. Dengan amobilisasi, enzim dapat dipergunakan berulang kali karena stabilitas yang terjaga lebih baik sehingga menghemat waktu dan biaya (Suhartono, 1989). Urilase bebas memiliki stabilitas antara pH 7 hingga 11 dan pH optimum 8,5 (Jiangou, 1994).

Media amobilisasi enzim dapat menyebabkan perubahan pada enzim amobil yaitu pada aktivitas dan stabilitas enzim yang diamobilkan, aktivitas enzim akan maksimum bila enzim berada pada kondisi optimum. Aktivitas maksimum urilase dalam keadaan bebas dan teramobilkan dalam media tertentu akan memiliki pH optimum yang berbeda. Hal ini dikarenakan ketika berinteraksi, baik enzim maupun matriks pendukung akan mengalami perubahan, dimana pemasangan antara suatu sisi aktif pada substrat menekankan adaptasi sisi aktif untuk mencocokkan gugus fungsi pada substrat. Pengaruh pH yang mungkin terjadi yakni mengubah keadaan ionisasi dari gugus-gugus yang terlibat dalam katalisis, gugus-gugus yang terlibat dalam pengikatan substrat, gugus-gugus yang terlibat dalam pengikatan sisi selain sisi aktif dan gugus-gugus pada substrat. Keadaan bermuatan yang telah berubah ini akan mempengaruhi afinitas enzim terhadap substratnya serta mempengaruhi laju reaksinya (Ngili, 2009).

Efek pH pada enzim berkaitan dengan keadaan ionisasi dari sistem yang dikatalisis ini, termasuk substrat, dan enzim itu sendiri.

Perubahan pH dapat mempengaruhi keadaan ionisasi dari asam-asam amino pada sisi aktif enzim sehingga akan mempengaruhi interaksinya dengan molekul substrat. Kadar pH yang terlalu tinggi atau terlalu rendah akan menyebabkan ketidakstabilan pada konformasi enzim sehingga menyebabkan struktur pada enzim rusak. Enzim mempunyai pH optimum yang akan menyebabkan aktivitas maksimal. Keadaan optimum ini dihubungkan dengan saat gugus pemberi proton atau penerima proton yang aktif pada sisi enzim berada pada kondisi ionisasi yang tepat (Lehninger, 2004).

Adapun jenis dari media amobilisasi yang dapat digunakan yaitu biopolymer hidrofilik yang didasarkan pada polisakarida alami seperti agar, dextran dan selulosa, polimer organik sintesis seperti poliakrilamida, polistirena, dan nilon serta material anorganik seperti gelas berpori (SiO_2) Syarat penting dari media yang dapat digunakan sebagai media amobilisasi yaitu :

1. Tidak larut dalam air
2. Bersifat inert
3. Memiliki kapasitas ikat enzim yang tinggi dan stabil
4. Berupa padatan stabil dalam penyimpanan dan jangka waktu yang lama

Menurut Chibata (1978), teknik amobilisasi enzim pada prinsipnya dikelompokkan menjadi tiga kelompok yaitu metode ikatan dengan matriks, metode ikatan silang dan metode penjebakan.

1. Metode ikatan dengan matriks (adsorpsi)

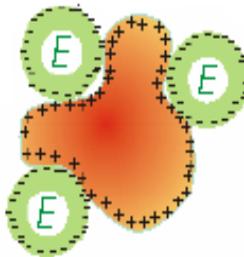
Metode ini merupakan metode amobilisasi pertama yang ditemukan. Metode ini didasarkan pada pengikatan enzim langsung pada matriks yang tidak larut dalam air dan dapat dibedakan lagi atas tiga macam berdasarkan cara pengikatannya, yaitu adsorpsi fisik, ikatan ionik, dan ikatan kovalen. Matriks yang dapat digunakan untuk amobilisasi dengan sistem ikatan diantaranya polisakarida tidak larut air (selulosa, dekstran, dan turunan agarosa), protein (gelatin dan albumin), polimer sintetik (resin ion exchange dan gel poliakrilamida), bahan organik (gelas berpori, silica, ion metal dan tanah alkali). Pemilihan teknik ini tergantung pada enzim itu sendiri. Beberapa aspek yang perlu diperhatikan adalah ukuran partikel, luas permukaan, rasio molar termasuk hidrofilik atau hidrofobik dan komposisi kimia.

Metode baru ini mempunyai beberapa keuntungan, yaitu enzim dapat dipakai secara berulang, memudahkan kontrol reaksi, kualitas produk terjaga, proses dapat berlangsung secara berkesinambungan, tanpa kontaminasi enzim (protein) lain, memudahkan pemisahan enzim dari produk, enzim akan mempunyai fungsi katalitik pada kisaran pH yang lebih tinggi dan kurang sensitif terhadap panas (Muchtadi dkk, 1992). Menurut Palmer (1991) metode amobilisasi enzim ikatan Carier (Carier Binding) yaitu metode yang akan mengikat enzim pada matriks yang tidak larut dalam air.

Jenis adsorpsi dapat dibedakan menjadi dua macam yaitu (Khaeruddin *et al.*, 2007):

a. *Physical adsorption* (Adsorpsi fisik)

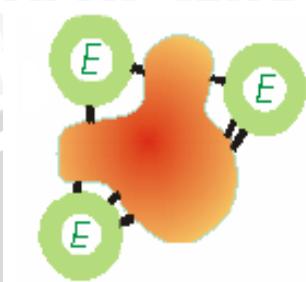
Adsorpsi fisik adalah adsorpsi yang terjadi akibat gaya interaksi tarik-menarik antara molekul adsorben dengan molekul adsorbat. Adsorpsi ini melibatkan gaya-gaya Van der Waals. Jenis ini digunakan untuk proses adsorpsi yang membutuhkan proses regenerasi, karena zat yang teradsorpsi tidak masuk dalam adsorben tapi hanya sampai permukaan saja. Enzim yang terikat secara adsorpsi fisik ditunjukkan pada Gambar 2.8



Gambar 2.2. Enzim yang terikat secara adsorpsi fisik

b. *Chemical adsorption* (Adsorpsi kimia)

Adsorpsi kimia adalah adsorpsi yang terjadi akibat interaksi kimia antara molekul adsorben dengan molekul adsorbat. Proses ini pada umumnya menurunkan kapasitas adsorben, karena gaya adhesinya yang kuat, sehingga proses ini tidak reversibel. Enzim yang terikat secara adsorpsi kimia ditunjukkan pada Gambar 2.9.



Gambar 2.3. Enzim yang terikat secara adsorpsi kimia

2. Metode ikatan silang

Metode ikatan silang didasarkan atas pembentukan ikatan kimia, seperti pada metode ikatan kovalen, tetapi tidak menggunakan matriks yang tidak larut. Amobilisasi enzim terjadi melalui komponen bi-atau multifungsional. Sebagai komponen pengikat dapat digunakan gluraldehida, turunan bis-diazobenzidin, dan lain-lain. Enzim yang diamobilisasi dengan metode ini sering bersifat gel sehingga sukar ditangani.

3. Metode penjebakan

Metode penjebakan dapat dibedakan atas 2 macam yaitu

a. Penjebakan di dalam kapsul (mikroenkapsulasi), yang merupakan pemasukan enzim ke dalam membran polimer semipermeabel. Hasil mikroenkapsulasi umumnya mempunyai ukuran yang bervariasi mulai dari satu mikron sampai beberapa mikron.

b. Penjebakan di dalam matriks polimer

Enzim yang diamobilisasi dijerat di dalam polimer sintetik atau alami. Menurut Muchtadi, dkk (1992), metode ini didasarkan pada penempatan enzim dalam kisi atau suatu ruang dalam suatu polimer atau dalam membran semi permeable yang pertama digolongkan ke dalam jenis kisi sedang yang kedua digolongkan ke dalam jenis mikokapsul. Bahan yang digunakan sebagai penjebak antara lain K^+ karagenan, Ca^+ alginate, dan poliakrilamida. Dari ketiga bahan tersebut poliakrilamida merupakan bahan pendukung yang paling stabil dan tidak terlalu mempengaruhi sifat enzim (Goel,1994).

Sifat dari enzim amobil berbeda dengan enzim yang terdapat bebas dalam larutan, ini tergantung dari metode amobilisasi dan

carier yang digunakan. Penurunan pada aktivitas spesifik muncul saat enzim diamobilisasi dengan melibatkan proses kimia yang dapat memungkinkan terjadinya denaturasi. Bagaimanapun carier membentuk lingkungan mikro baru bagi enzim dan hal tersebut dapat mempengaruhi aktivitas. Sebagai contoh, karakteristik enzim dapat berubah jika sisi aktif mengalami perubahan konformasi sebagai hasil interaksi antara enzim dan carier. Carier dapat mempengaruhi karakteristik enzim dengan membentuk rintangan sterik dengan pencegahan difusi bebas dari substrat ke semua molekul enzim atau dengan membentuk interaksi elektrostatis dengan molekul substrat atau produk (Palmer, 1991).

Sedangkan menurut Goel (1994), enzim yang diamobilkan akan mengalami perubahan komposisi yang dimungkinkan akibat dari sisi aktif enzim yang berikatan dengan matriks sehingga mengakibatkan berkurangnya katalitik enzim tersebut. Disamping itu stabilitas enzim teramobil tergantung dari lingkungan mikro yang dapat menyebabkan protein dasar dari enzim terdenaturasi atau tetap stabil. Lingkungan mikro dapat didefinisikan sebagai lingkungan yang mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan mikroba atau untuk enzim yang diproduksi mikroba.

Enzim yang diamobilisasi dapat kehilangan aktivitasnya karena beberapa hal yaitu (Fardiaz, 1988) :

- 1) Beberapa enzim mungkin diamobilisasi pada matriks dengan konfigurasi sedemikian rupa sehingga menghambat kontak antara substrat dengan sisi aktif enzim.
- 2) Gugus reaktif pada sisi aktif enzim mungkin ikut terikat pada matriks. Perlindungan sisi aktif oleh inhibitor reversible selama pengikatan akan mempertahankan aktivitasnya.
- 3) Molekul enzim selama pengikatan mungkin berubah menjadi konfigurasi inaktif.
- 4) Kondisi reaksi selama pengikatan mungkin menyebabkan denaturasi atau inaktivasi enzim.

Selain itu

Disamping itu, amobilisasi enzim berdampak pada perubahan kinetika dan beberapa sifat enzim yang biasanya disertai dengan menurunnya aktivitas spesifik enzim. Beberapa factor yang biasanya berubah antara lain efek konformasi dan sterik, efek partisi, dan efek transfer massa. Efek konformasi dan sterik diakibatkan oleh ikatan kovalen yang terbentuk antara enzim dan bahan penyangga yang

menyebabkan perubahan struktur tiga dimensi enzim, sehingga berpengaruh pada gugus aktif enzim dan pembentukan halangan sterik. Efek partisi disebabkan oleh muatan atau sifat hidrofobik bahan penyangga yang ditandai dengan perbedaan konsentrasi spesies bermuatan, substrat produk, ion hidrogen, ion hidroksil, dan lainnya dalam lingkungan mikro enzim amobil dan dalam area dari larutan. Efek transfer massa atau difusi akan timbul bila enzim diamobilisasi pada permukaan atau didalam suatu matriks berupa padatan, karena substrat harus berdifusi dari larutan ke gugus aktif enzim. Bila enzim menempel pada bahan penyangga tak berpori, efek transfer massa hanya terjadi pada permukaan luar yang aktif. Tetapi bila enzim diamobilisasi di dalam bahan penyangga berpori, maka selain efek transfer massa eksternal, difusi internal substrat serta difusi produk ke larutan dapat tertahan (Cabral. 2002). Enzim terimobilisasi juga dipengaruhi oleh pH optimum enzim amobil. Penyebab perubahan pH yaitu akibat distribusi ion yang tidak seragam antara ion H^+ , ion OH^- dan substrat bermuatan. pH optimum enzim amobil juga dipengaruhi oleh carrier yang digunakan, apabila carrier bermuatan negatif, misal CMC, maleic anhydride/etilen, asam galakturonat, asam poliaspartat maka pH optimum bersifat basa sedangkan jika carrier bermuatan positif, misal DEAE-selulosa, polimer polyornithyl maka pH lebih asam (Engaser, 1986).

2.1.2.1. Enzim Urikase

Urikase (*urate-oxygen oxydoreduktase*) adalah enzim yang mengkatalisis oksidasi asam urat dengan molekul O_2 bertindak sebagai aseptor elektron. Produk dari reaksi enzimatik ini adalah H_2O_2 dan allantoin. Urikase adalah salah satu golongan oksidase yang memindahkan sepasang elektron dari substrat yaitu asam urat ke oksigen membentuk H_2O_2 (Suhartono, 1989). Enzim urikase dapat diperoleh dari hati babi, *Candida utilis* (Suhartono, 1989), *candida* sp (Jianguo, 1994), *Micrococcus biteus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus Oryzae*, *Streptomyces gannmycisus*, *Candida tropicalis* (Tanaka, 1977).

Pada penelitian ini, enzim urikase diperoleh dari *Candida utilis*. *Candida utilis* pertama ditemukan oleh Henneberg (1926) sebagai kontaminan pabrik ragi di Jerman dan diberi nama *Torula Utilis*. Ragi ini banyak digunakan untuk membuat makanan ternak.

Lodder and Kreger (1952) memasukkan ragi ini dalam genus *Candida*. Penggunaan *Candida utilis* sangat luas, dapat ditumbuhkan pada berbagai macam medium dan dapat dipergunakan sebagai makanan manusia dan hewan.

Candida utilis dapat hidup dalam larutan garam, dalam medium yang tidak mengandung vitamin, dapat mengasimilasi kalium nitrat, dapat menggunakan sumber karbon seperti glukosa, sukrosa, maltosa, larutan pati, rafinosa, dan gliserol. Kondisi optimum pertumbuhan *Candida utilis* adalah pada pH 4,5 dan suhu 30°C. *Candida utilis* sangat penting dalam food yeast. Hal ini disebabkan karena *Candida utilis* mempunyai kemampuan adaptasi yang tinggi, efisiensi dan fleksibilitas dalam lingkungan tertentu. Terutama dalam lingkungan yang merupakan perpaduan dari senyawa-senyawa nitrogen (Suhartono, 1989).

Enzim yang dihasilkan oleh *Candida utilis* tergantung pada sumber nitrogen dari medium pertumbuhannya, dimana urikase akan dihasilkan bila *Candida utilis* ditumbuhkan dalam medium asam urat sebagai sumber nitrogennya. Enzim urikase dari *Candida utilis* bersifat intraselluler sehingga untuk isolasinya diperlukan tahap pemecahan dinding sel. Menurut Jiangou (1994), enzim urikase yang diisolasi dari *Candida* adalah sebagai berikut :

- pH optimum : 8,5
- Suhu optimum : 30°C
- Aktivitas spesifik : 0,05 – 7,00 (μ /mg protein)
- Stabilitas termal : 45°C ; 5 menit
- K_M (asam urat) : $5,26 \times 10^{-4}$ mol/L
- Berat molekul : 70000 – 76000
- Titik esoelektrik : pH 5,6

Matriks pendukung yang digunakan untuk amobilisasi enzim salah satunya adalah selulosa. *Nata de coco* atau *bacterial cellulose* merupakan salah satu sumber alternatif bagi penyediaan selulosa. *Nata de coco* diperoleh dari hasil proses fermentasi air kelapa menggunakan *Acetobacter xylinum*. Kandungan utama *nata de coco* adalah selulosa bacterial yang memiliki beberapa keunggulan antara lain kemurnian tinggi, Derajat kristanilitas tinggi, mempunyai kerapatan anatara 300 dan 900 kg/m³, kekuatan tarik tinggi, elastis dan terbiodegradasi (Krystinowicz, 2001; Piluharto, 2003).

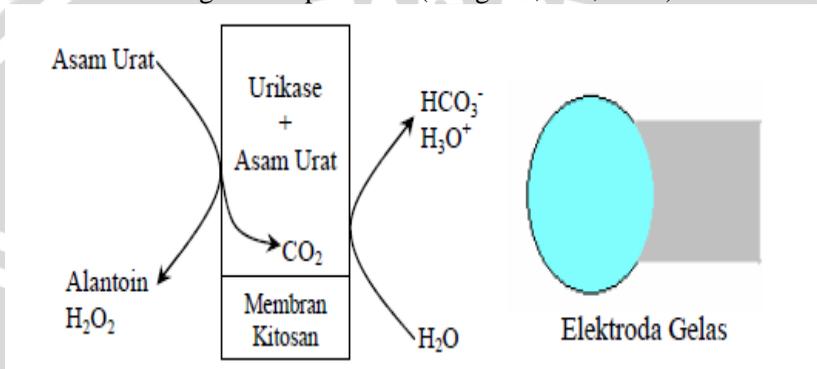
Pembuatan membran *nata de coco* diawali dengan mendidihkan air kelapa dan gula kemudian setelah melalui pendinginan pada suhu kamar ditambahkan starter (bakteri *Acetobacter xylinum* dalam medium cair). Kemudian difermentasi selama 7 hari. Setelah masa fermentasi selama 7 hari maka akan terbentuk gel pada permukaan media cairnya. Gel yang terbentuk ini disebut pellicle. Proses terbentuknya pellicle merupakan rangkaian aktifitas bakteri *Acetobacter xylinum* dengan nutrisi yang ada pada media cair. Karena *Acetobacter xylinum* adalah bakteri yang memproduksi selulosa, maka nutrisi yang berperan adalah nutrisi yang mengandung glukosa. Dalam penelitian ini nutrisi yang mengandung glukosa adalah air kelapa dan gula pasir. Pada gula pasir, glukosa terbentuk melalui reaksi hidrolisis sukrosa dengan air (Piliharto, 2003).

2.3. Biosensor potensiometri asam urat

Asam urat ($C_5H_4N_4O_3$) merupakan produk akhir dari proses metabolisme basa purin dalam tubuh manusia (Schrenkhammer, 2008). Asam urat apabila dioksidasi akan menghasilkan alantoin, H_2O_2 dan CO_2 (Arslan, 2008). Kadar asam urat normal pada pria berkisar antara 3,5 – 7 mg/dL dan pada perempuan berkisar antara 2,6 – 6 mg/dL. Pengendalian asam urat didalam tubuh sangat penting karena jika melebihi batas normal dapat menyebabkan penyakit seperti encok, sindrom Lesh-Nyhan, gagal ginjal, hyperuricaemia dan gangguan fisiologis (Schrenkhammer, 2008). Oleh karena mengingat pentingnya mengetahui kadar asam urat maka perlu dikembangkan suatu alat analitik yang dapat digunakan untuk mendeteksi kadar asam urat dalam tubuh. Salah satu metode alternatif yang dapat dikembangkan yaitu biosensor. Keunggulan biosensor dibandingkan metoda analitik konvensional lainnya yaitu waktu respon yang cepat, mudah dibawa (portable), ringkas, ekonomis, dan dapat digunakan untuk pemantauan secara terus-menerus (Subroto, 2000).

Prinsip kerja dari biosensor asam urat didasarkan pada reaksi oksidasi asam urat oleh urikase yang menghasilkan alantoin, H_2O_2 dan gas CO_2 . Prinsipnya adalah saat elektroda yang terhubung dengan bioreseptor kontak dengan analit, akan terjadi perubahan potensial. Perubahan potensial ini terjadi karena adanya perbedaan aktivitas ion analit dari reaksi enzimatik. Parameter yang terukur

adalah potensial sel larutan dan persamaan yang digunakan adalah persamaan Nernstian (Chauvan, dkk., 2004). Reaksi oksidasi asam urat yang dikatalis oleh urikase menghasilkan CO_2 . Jumlah gas CO_2 yang dihasilkan bereaksi dengan air membentuk H_2CO_3 , dan terurai menjadi HCO_3^- dan H_3O^+ . Keberadaan ion H_3O^+ pada permukaan elektroda menyebabkan perubahan pH larutan, sehingga sensor yang digunakan adalah sensor pH, dimana akan terdeteksi oleh elektroda dan terukur sebagai beda potensial (Jiangou, dkk., 1994).

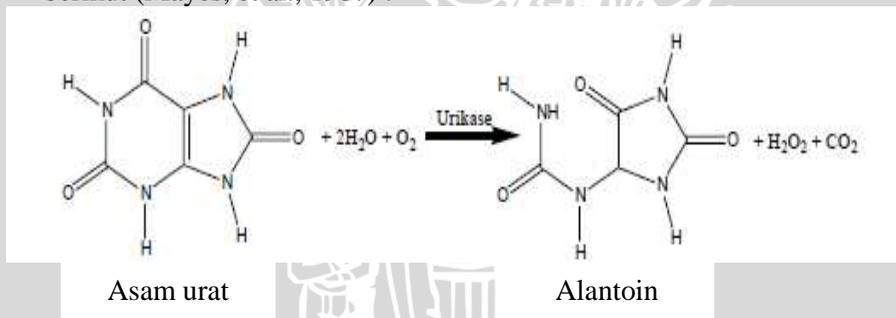


Gambar 2.4. Mekanisme Deteksi Asam Urat oleh Biosensor Asam Urat

Terdapat beberapa penelitian mengenai biosensor asam urat yang telah dikembangkan yaitu biosensor asam urat dengan menggunakan transduser potensiometri, amperometri, konduktometri, serta biosensor optik. Pada biosensor asam urat potensiometri dibuat dengan menggunakan enzim urikase, katalase, dan mediator elektron (Ferrocenecarboxylic acid, FcA) yang diamobilkan dalam 3-glisidiloksipropiltrimetoksilan (GPTS). Penentuan asam urat dapat dicapai dari reduksi H_2O_2 oleh katalase dan oksidasi ferrosene pada pH 7,5. Metode ini mempunyai kisaran konsentrasi antara 2 mg/dL – 7 mg/dL dan batas deteksi 3,4 mg/dL. Namun pada metode ini mempunyai selektifitas dan stabilitas yang rendah (Liao, 2006). Penelitian yang dilakukan Nizar (2008) yaitu biosensor potensiometri asam urat dengan menggunakan elektroda gelas yang dilapisi oleh enzim urikase yang teramobilkan dalam membran kitosan. Penentuan asam urat dilakukan berdasarkan reaksi oksidasi H_2O_2 secara enzimatik pada pH 9,0. Kepekaan biosensor asam urat mencapai maksimum dengan bilangan Nernst 28,8

mV/dekade dengan batas deteksi 9,98 ppm dan waktu respon 270 detik. Sedangkan penelitian yang telah dilakukan Arslan (2008) yaitu biosensor asam urat amperometri dengan menggunakan urikase yang diamobilkan dalam lapisan polianilin-polipirol (pany-ppy) dan glutaraldehid secara ikatan silang pada elektroda Pt. Deteksi dari biosensor amperometri ini diukur berdasarkan pengukuran arus yang dihasilkan oleh oksidasi gas H_2O_2 secara enzimatik pada potensial 0,4 V, pH 9,0 pada suhu $55^\circ C$ (Arslan, 2008). Metode biosensor dengan transduser amperometri lainnya yang telah dikembangkan yaitu biosensor asam urat yang didasarkan pada transfer elektron secara langsung dari hemoglobin yang diencapsulasi dalam kitosan dengan elektroda karbon gelas, dimana enzim urikase diamobilkan pada membran kitosan hemoglobin. Penentuan asam urat dapat dicapai jika terjadi reduksi hydrogen peroksida oleh Hb. Biosensor ini memiliki kepekaan $29,5 \mu A mM^{-1}$, koefisien korelasi 0,9982, batas deteksi $0,85 \mu M$ dan kisaran konsentrasi 2-30 μM (Zhao, 2009).

Reaksi yang terjadi pada biosensor asam urat adalah sebagai berikut (Mayes, et al., 1987) :



Gambar 2.5. Reaksi oksidasi asam urat oleh enzim urikase (Mayes, et al., 1987)

Potensial sel elektrode gelas dipengaruhi oleh pH larutan yang digunakan. pH larutan berhubungan dengan aktivitas enzim urikase. Pada penelitian Setyawati (2008), menggunakan membran kitosan-glutaraldehid sebagai media amobilisasi, enzim urikase memiliki aktifitas optimum pada pH 9. Potensial sel pada elektrode gelas seperti pada persamaan (Wang, 2001) :

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

$$E_{\text{sel}} = K - 0,0592 \text{ pH} \quad (2.2)$$

Maka E_{sel} pada elektrode gelas hanya dipengaruhi oleh nilai H^+ . Persamaan (2.2) menjadi :

$$E_{\text{sel}} = K + 0,0592 \log (10^{-9}) = E_1 \quad (2.3)$$

Potensial sel selain dipengaruhi oleh pH juga dipengaruhi oleh konsentrasi asam urat. Persamaan (2.3) akan menjadi :

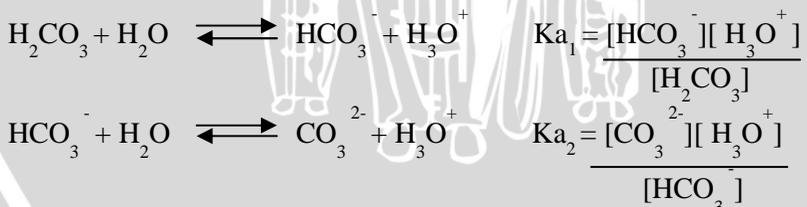
$$E_{\text{sel}} = E_1 + E_{\text{sel}} \text{ asam urat} = E_2 \quad (2.4)$$

Nilai perubahan potensial sel (ΔE_{sel}) diperoleh dari selisih antara potensial sel *nata de coco* -urikase amobil dengan potensial sel tanpa menggunakan *nata de coco* -urikase amobil. Persamaannya adalah :

$$\begin{aligned} \Delta E_{\text{sel}} &= E_2 - E_1 \\ &= E_1 + E_{\text{sel}} \text{ asam urat} - E_1 = E_{\text{sel}} \text{ asam urat} \end{aligned} \quad (2.5)$$

Dari persamaan (2.5) dapat diketahui bahwa perbedaan potensial sel hanya dipengaruhi oleh E_{sel} dari asam urat.

Pada reaksi asam urat dengan urikase, asam urat setara dengan CO_2 yang dihasilkan, CO_2 dalam larutan akan menghasilkan H_2CO_3 yang mengalami ionisasi membentuk ion H_3O^+ sehingga akan terjadi perubahan pH 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:

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

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

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

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

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

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

K

Persamaan tersebut kemudian disubstitusikan pada persamaan 2.2 dan didapatkan:

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

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

$$= K - 0,0592 K + 0,0296 \log \text{CCO}_2$$

K

$$E_{\text{sel}} = K + 0,0296 \log \text{CCO}_2$$

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

$$E_{\text{sel}} = K + 0,0296 \log C_{\text{asam urat}} \quad (2.7)$$

$$E_{\text{sel}} = K - 0,0296 \text{ pAsam urat} \quad (2.8)$$

Dari perhitungan ini, harga bilangan Nernst secara teoritis pada biosensor asam urat adalah 0,0296 V/dekade.

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

2.4. Kinerja Biosensor

2.4.1. Penentuan Kisaran Konsentrasi dan Batas Deteksi

Kisaran konsentrasi pengukuran dapat diketahui dengan membuat kurva hubungan antara log [asam urat] terhadap E_{sel} . Batas deteksi menunjukkan batas konsentrasi terendah yang dapat direspon oleh biosensor yang diperoleh dari perpotongan garis singgung antara garis linier dengan garis melengkung kurva hubungan E_{sel} (mV) dengan log [analit]. Perpotongan kedua garis singgung tersebut diekstrapolasikan pada sumbu x sehingga diperoleh konsentrasi dari batas deteksi.

2.4.2. Penentuan Kepekaan

Kepekaan biosensor potensiometri ditunjukkan oleh kemiringan dari grafik hubungan antara ΔE_{sel} dengan log [analit]. Besarnya kemiringan garis dari kurva tersebut adalah bilangan Nernst. Biosensor yang memiliki kepekaan tinggi, akan memiliki bilangan Nernst mendekati bilangan Nernst teoretis. Pada biosensor potensiometri urea dengan transduser sensor pH bilangan Nernst teoritisnya adalah $29,6 \pm 2,96$ mV/dekade.

2.4.3. Penentuan Waktu Respon

Waktu respon adalah waktu yang diperlukan suatu biosensor untuk memberikan respon potensial yang konstan. Hal ini disebabkan oleh terjadinya kesetimbangan reaksi yang terjadi pada elektroda. Makin cepat biosensor memberikan respon potensial yang konstan makin baik elektroda tersebut. Penentuan waktu respon dilakukan dengan membuat kurva hubungan antara waktu dan

potensial sel larutan asam urat. Pencatatan dilakukan selama 480 detik. Dari kurva tersebut, dapat ditentukan waktu respon biosensor asam urat. Waktu respon ini ditunjukkan oleh waktu dimana potensial sel larutan asam urat mulai memberikan harga potensial yang relatif tetap.

2.4.4. Penentuan Efisiensi

Larutan asam urat konsentrasi 10 – 30 ppm diukur potensial selnya dengan elektroda gelas dan biosensor. Pengukuran dilakukan berulang-ulang dengan menggunakan biosensor yang sama (enzim urikase amobil yang digunakan sama). Setelah itu, dibuat kurva hubungan antara bilangan Nernst dengan banyaknya pengukuran, lalu ditentukan banyaknya pengulangan pengukuran yang masih memberikan bilangan Nernst mendekati nilai teoritis.

2.5. Hipotesis

Kepekaan biosensor potensiometri asam urat dipengaruhi oleh pH larutan asam urat yaitu pada kisaran pH 7,0 hingga 9,5.

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Analitik dan Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni sampai dengan Agustus 2010.

3.2. Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah urikase hasil isolasi dari *Candida utilis*, asam urat, glukosa, NH_4Cl , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, NaOH, agar, natrium tartrat, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, glisin, kasein, natrium asetat, asam asetat glasial 100%, ekstrak yeast, H_3PO_4 , akuades,, alkohol 97% dan sampel serum darah.

3.2.2. Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi inkubator (merek *Heracus* tipe B-5042), *sentrifuge* dingin (merek *Jouan* tipe MR 18-22), *autoclave* (merek *All American Model 25X*), *shaker* (merek *Edmund* tipe 25), penangas air (merek *Memert NR 900660*), pH meter (merek *Schoot-Gerate* tipe CG.820), neraca analitik Mettler (tipe AE 50), pengaduk magnetik Ikamag RH, multitester, kawat platina, dan peralatan gelas.

3.3. Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang digunakan meliputi pembuatan urikase amobil yaitu penyiapan media, peremajaan kultur murni, isolasi urikase dari *Candida utilis*, pemurnian ekstrak kasar urikase, pembuatan membran *nata de coco*, amobilisasi urikase pada membran *nata de coco*, pembuatan biosensor asam urat, penentuan kinerja biosensor asam urat. Tahapan penelitian yang digunakan adalah sebagai berikut :

- a. Preparasi sampel yang meliputi: pembuatan larutan dan isolasi urikase dari *Candida utilis*, pembuatan membran *nata de coco*, pembuatan larutan *buffer* fosfat dan pembuatan larutan asam urat
- b. Amobilisasi Urikase pada membran *nata de coco*
- c. Perancangan biosensor asam urat
- d. Pengukuran potensial sel larutan

3.4. Cara Kerja

3.4.1. Preparasi alat dan bahan (Lampiran 1-2)

3.4.2 Amobilisasi urikase dalam membran *nata de coco*

Membran nata de dibilas dengan akuades steril kemudian itu direndam dalam 18 mL larutan enzim urikase selama 24 jam dan disimpan pada lemari es.

3.4.3. Perancangan biosensor asam urat

Elektroda gelas dikalibrasi dengan larutan *buffer* standar pH 7 kemudian larutan *buffer* standar pH 10. Setelah itu, enzim urikase yang telah diamobilkan pada membran *nata de coco* dilapiskan pada elektroda gelas yang telah dikalibrasi dan diikat dengan benang.

3.4.4. Pengukuran potensial sel

Pengukuran potensial sel dilakukan pada larutan asam urat dengan konsentrasi 5, 10, 15, 20, 25, 30 dan 35 ppm pada setiap pH yang dipelajari yaitu 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0 dan 9,5. Pengukuran dilakukan tanpa menggunakan membran dan dengan menggunakan urikase amobil pada membran *nata de coco* pada pH yang sesuai untuk setiap konsentrasi asam urat. Pembacaan potensial sel dilakukan dengan pengadukan dan dicatat setiap 8 menit.

3.4.5. Penentuan bilangan Nernst biosensor asam urat

Diukur potensial sel larutan asam urat konsentrasi 15, 17, 19, 21, 23, 25 dan 30 ppm dengan elektroda gelas dan biosensor asam urat, kemudian dibuat kurva hubungan antara selisih nilai potensial sel (ΔE_{sel}) dari kedua pengukuran dan $\log [\text{asam urat}]$ dengan sumbu x adalah $\log [\text{asam urat}]$ dan sumbu y adalah ΔE_{sel} , setelah itu

ditentukan persamaan garis $y = a + bx$. Nilai b dari persamaan merupakan harga bilangan Nernst.

3.4.6. Penentuan kisaran konsentrasi dan batas deteksi biosensor asam urat

Larutan asam urat 15, 17, 19, 21, 23, 25 dan 30 ppm diukur potensial selnya dengan elektroda gelas dan biosensor asam urat. Kemudian dibuat kurva hubungan antara selisih potensial sel (ΔE_{sel}) dari kedua pengukuran dan $\log [\text{asam urat}]$ dengan sumbu x adalah $\log [\text{asam urat}]$ dan sumbu y adalah ΔE_{sel} .

Kisaran konsentrasi pada kurva ditentukan dari daerah linier yang memberikan ΔE_{sel} secara signifikan terhadap perubahan konsentrasi (daerah yang memenuhi persamaan Nernst).

Batas deteksi ditentukan dari kurva yang digunakan untuk penentuan kisaran konsentrasi. Dari kurva ditentukan persamaan garis singgung pada daerah yang memenuhi persamaan Nernst (daerah linier) dan daerah non linier, setelah itu dibuat titik potong diantara kedua daerah tersebut. Nilai absis (sumbu x) dari titik potong menunjukkan batas deteksi dari biosensor asam urat.

3.4.7. Penentuan waktu respon biosensor asam urat

Larutan asam urat konsentrasi 15, 17, 19, 21, 23, 25 dan 30 ppm diukur potensial selnya dengan elektroda gelas dan biosensor asam urat setiap 30 detik selama 600 detik. Setelah itu dibuat kurva hubungan antara waktu dengan selisih dari kedua pengukuran potensial sel larutan asam urat (ΔE_{sel}), kemudian dari kurva tersebut ditentukan waktu dimana potensial sel larutan asam urat mulai memberikan harga yang relatif tetap.

3.4.8. Penentuan lama pemakaian biosensor asam urat

Larutan asam urat konsentrasi konsentrasi 15, 17, 19, 21, 23, 25 dan 30 ppm diukur potensial selnya dengan elektroda gelas dan biosensor. Pengukuran dilakukan berulang-ulang dengan menggunakan biosensor yang sama (enzim urikase amobil yang digunakan sama). Setelah itu, dibuat kurva hubungan antara bilangan Nernst dengan banyaknya pengukuran, lalu ditentukan banyaknya pengulangan pengukuran yang masih memberikan bilangan Nernst mendekati nilai teoritis.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Pengaruh pH terhadap Kinerja Biosensor Asam Urat

Penentuan pH optimum dari biosensor potensiometri asam urat dengan menggunakan urikase amobil dalam membran *nata de coco* ini dilakukan dengan menggunakan larutan asam urat pada pH 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0 dan 9,5. pH ini dipilih karena urikase bebas memiliki pH optimum sebesar 8,5 (Jiangou, 1994). Pada penelitian ini, penentuan pH optimum diteliti karena perubahan pH larutan dapat mempengaruhi aktivitas enzim dimana aktivitas enzim sangat berperan terhadap kinerja biosensor potensiometri asam urat. Dari hasil penelitian dapat diketahui harga potensial sel masing-masing pH pada berbagai konsentrasi yang disajikan pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Harga potensial sel pada pH 7 – 9,5 dengan Konsentrasi Asam Urat 0-35 ppm

[asam urat] (ppm)	E_{sel} (mV)					
	pH 7,0	pH 7,5	pH 8,0	pH 8,5	pH 9,0	pH 9,5
0	-79	-81	-106	-114	-169	-131
1	-50	-64	-87	-105	-165	-125
5	-44	-60	-83	-103	-166	-134
10	-41	-59	-80	-102	-166	-129
15	-39	-56	-79	-102	-159	-123
20	-37	-55	-79	-101	-161	-129
25	-37	-54	-78	-101	-159	-120
30	-37	-54	-78	-100	-156	-120
35	-37	-53	-78	-100	-157	-124

Berdasarkan Tabel 4.1 diketahui bahwa terjadi penurunan potensial sel dengan adanya peningkatan pH pada pengukuran potensial sel larutan asam urat. Hal ini sesuai dengan persamaan (2.2) yang menyebutkan bahwa peningkatan pH akan mengakibatkan

penurunan potensial sel yang terukur. Prinsip kerja biosensor asam urat didasarkan pada reaksi oksidasi asam urat yang dikatalis oleh urikase menghasilkan CO_2 . Molekul CO_2 yang dihasilkan bereaksi dengan air membentuk H_2CO_3 , dan terurai menjadi HCO_3^- dan H_3O^+ . Keberadaan ion H_3O^+ ini akan menghasilkan potensial sel, sehingga semakin besar jumlah H_3O^+ dalam larutan akan mengakibatkan potensial sel yang terukur semakin kecil.

Dari Tabel 4.1 ini juga dapat diketahui bahwa nilai potensial sel yang dihasilkan semakin positif dengan naiknya konsentrasi asam urat. Hal ini dapat dilihat dari konsentrasi larutan asam urat 0 ppm hingga 35 ppm terjadi peningkatan nilai potensial sel. Pada penelitian mengindikasikan bahwa terjadi peningkatan konsentrasi H_3O^+ dalam larutan yang menyebabkan peningkatan potensial sel yang terukur (Wang, 2001). Peningkatan konsentrasi H_3O^+ yang sebanding dengan kenaikan konsentrasi asam urat menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi asam urat, maka kemampuan enzim urikase untuk mengubah asam urat menjadi CO_2 juga meningkat. pH larutan ini juga berpengaruh pada jumlah ion H_3O^+ bebas dalam larutan. Karena dalam air, CO_2 akan terdisosiasi membentuk H_3O^+ sesuai persamaan (2.6).

Tabel 4.2. Hubungan pH, bilangan Nernst dan aktivitas urikase amobil

pH	Bilangan Nernst (mV/dekade)	Kisaran Konsentrasi (ppm)
7,0	6,22	1 – 35
7,5	6,48	1 – 35
8,0	8,99	1 – 35
8,5	11,75	20 – 30
9,0	28,11	20 – 30
9,5	23,45	5 – 15

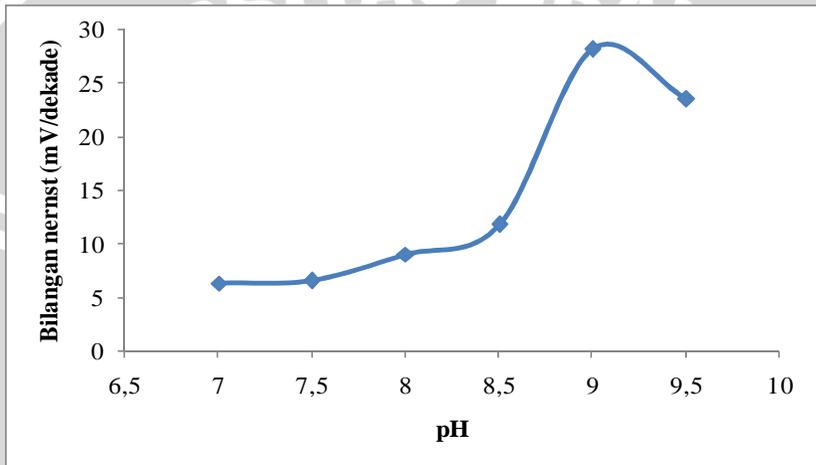
Tabel 4.2 menunjukkan perbedaan pH berpengaruh terhadap harga bilangan Nernst yang dihasilkan. Pada Tabel ini diketahui bahwa masing – masing pH memiliki batas deteksi yang berbeda-beda. Pada pH 7,0 hingga 8,0 menunjukkan kisaran konsentrasi

biosensor asam urat bekerja maksimal pada konsentrasi asam urat 1 – 35 ppm, sedangkan pada pH 8,5 dan 9,0 biosensor asam urat bekerja pada kisaran konsentrasi 20 – 30 ppm dan pada pH 9,5 bekerja kisaran konsentrasi 5 - 15 ppm. Kisaran konsentrasi paling lebar diperoleh pada rentang pH 7,0 hingga 8,5. Akan tetapi, harga bilangan Nernst pada rentang pH 7,0 hingga 8,5 jauh dari harga bilangan Nernst teoritis yaitu 29,6 mV/dekade. Berdasarkan hal tersebut, diketahui bahwa pada kondisi kisaran konsentrasi pengukuran yang lebar dengan batas deteksi yang rendah belum tentu menghasilkan bilangan Nernst yang mendekati teoritis.

Pada penelitian ini enzim diamobilkan pada membran *nata de coco* secara adsorpsi dimana pH sangat berpengaruh terhadap aktivitas enzim yang teramobil dalam membran *nata de coco*. Metode amobilisasi merupakan faktor utama yang menentukan kekuatan terikatnya enzim pada media amobilisasi dan sangat menentukan aktivitas enzim serta pH optimum enzim amobil. Penyebab perubahan pH yaitu akibat distribusi ion yang tidak seragam antara ion H^+ , ion OH^- dan substrat bermuatan. pH optimum enzim amobil juga dipengaruhi oleh carrier yang digunakan. Metode amobilisasi secara adsorpsi merupakan suatu proses pergerakan komponen dari satu fasa menuju permukaan fasa lain. Dalam hal ini, enzim urikase adalah komponen yang bergerak menuju permukaan membran *nata de coco*. Amobilisasi urikase dalam membran *nata de coco* ini menyebabkan terjadinya perubahan pH optimum, yaitu pada urikase bebas pH 8,5 (Jiangou, 1994), sedangkan pada urikase amobil adalah pH 9,0. Hal ini diduga merupakan suatu efek dari amobilisasi yang dilakukan. Menurut Engaser dan Horvarth (1986) menyebutkan bahwa amobilisasi enzim menyebabkan terjadinya efek partisi sehingga mengakibatkan perbedaan nilai pH optimum amobil dibandingkan enzim bebas. Efek partisi ini terjadi karena adanya interaksi elektrostatis atau interaksi lain antara matriks dengan enzim yang disebabkan konsentrasi pada lingkungan mikro berbeda dengan analitnya.

Gambar 4.1 menunjukkan harga bilangan Nernst meningkat dengan adanya kenaikan pH larutan dari pH 7,0 hingga 9,0 dan mencapai maksimum pada pH 9,0 dengan nilai bilangan Nernst sebesar 28,11 mV/dekade. Nilai bilangan Nernst yang semakin mendekati teoritis pada penelitian ini menunjukkan bahwa biosensor bekerja pada pH optimumnya dimana muatan gugus samping asam

amino berada pada keadaan yang sesuai sehingga enzim sangat efisien dalam mempercepat reaksi biokimia sehingga terjadi peningkatan konsentrasi H_3O^+ , sehingga kemampuan enzim urikase untuk mengubah asam urat menjadi CO_2 juga meningkat sehingga pada kurva dapat terlihat adanya peningkatan harga bilangan Nernst yang tajam pada pH 9. Nilai bilangan Nernst mengalami penurunan pada pH 9,5 disebabkan karena aktivitas urikase amobil yang tidak maksimum sehingga menurunkan kepekaan biosensor.



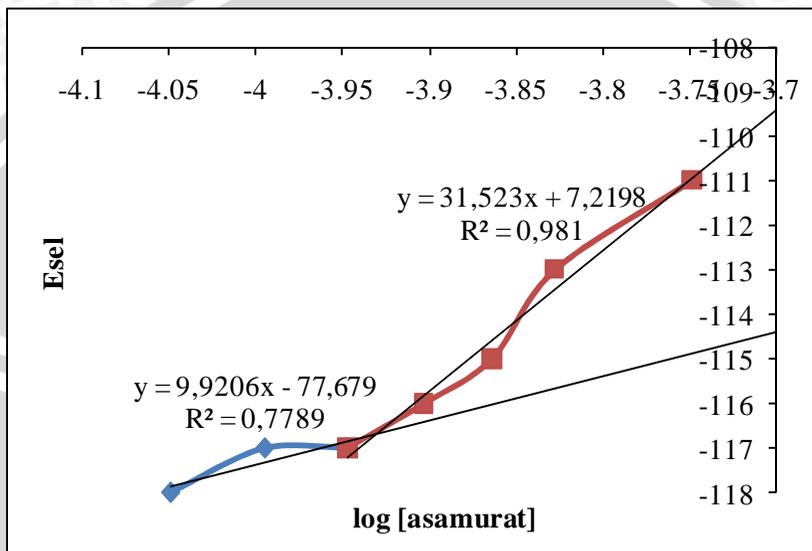
Gambar 4.1. Kurva Bilangan Nernst pada berbagai pH

4.2. Karakterisasi Biosensor Asam Urat

Kinerja biosensor yang ditentukan antara lain waktu respon, bilangan Nernst, kisaran konsentrasi, batas deteksi, dan lama pemakaian. Karakterisasi dilakukan pada pH optimum yaitu pH 9,0. Digunakan pH 9,0 karena pada pH ini menunjukkan aktivitas urikase yang mencapai maksimum pada pH 9,0.

Bilangan Nernst merupakan salah satu parameter kinerja biosensor yang menunjukkan kepekaan biosensor. Kepekaan biosensor asam urat akan memberikan gambaran tentang kemampuan biosensor asam urat dalam merespon perubahan konsentrasi asam urat yang terdapat dalam larutan. Secara teoritis, bilangan Nernst biosensor asam urat yaitu $29,6 \pm 2,96$ mV/dekade. Nilai bilangan Nernst yang mendekati teoritis menunjukkan bahwa hubungan antara E_{sel} dengan konsentrasi asam urat semakin tinggi sehingga biosensor yang dihasilkan memiliki kepekaan yang

semakin tinggi terhadap larutan analit yang diukur. Pengukuran faktor Nernst dilakukan dengan membuat grafik antara log [asam urat] dengan potensial (mV) yang terukur. Grafik yang diperoleh merupakan garis lurus pada selang konsentrasi tertentu.



Gambar 4.2. Kurva Bilangan Nernst dan Batas Deteksi

Pada penelitian diperoleh bilangan Nernst sebesar 31,52 mV/dekade seperti yang terlihat dari gambar 4.2. Bilangan Nernst yang dihasilkan dari penelitian dipengaruhi oleh enzim urikase yang teramobilkan pada membran, dimana enzim yang diamobilkan dapat menyebabkan penurunan aktivitas enzim. Struktur protein enzim dijaga oleh interaksi ionik. Apabila terjadi perubahan pH lingkungan, misalnya pada pH terlalu asam, ion H^+ dapat berikatan dengan sisi aktif atau sisi lain dari enzim yang bermuatan negatif. Akibatnya terjadi tolakan muatan yang sama yang mengakibatkan struktur enzim menjadi terbuka, terbukanya struktur enzim dapat mengakibatkan perubahan konformasi pada sisi aktif enzim, sehingga apabila konformasi sisi aktif enzim tidak sama dengan substrat maka tidak dapat terjadi reaksi. Pada pH optimum konformasi enzim berada pada kondisi yang paling stabil dan paling dekat dengan kondisi biologis enzim, sehingga reaksi pembentukan

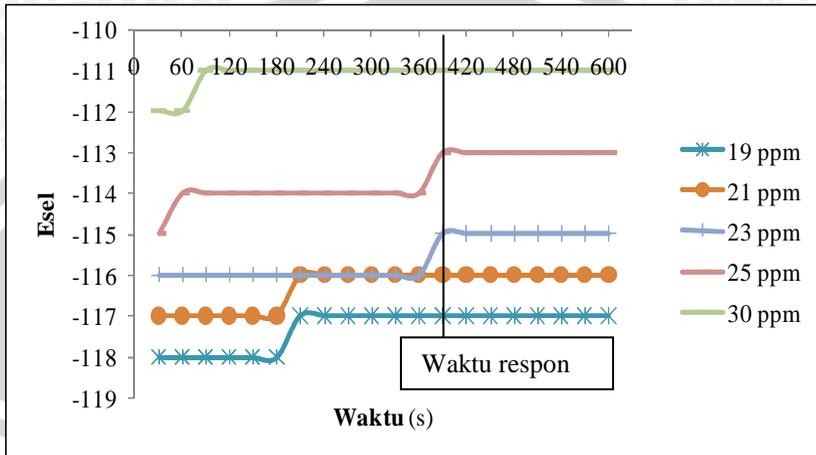
enzim-substrat menjadi optimum, dan aktivitas enzim pun dapat mencapai maksimal (Lehninger,1997).

Kisaran konsentrasi adalah rentang konsentrasi yang memberikan nilai E_{sel} yang sesuai dengan konsentrasi analit. Kisaran konsentrasi pengukuran dapat diketahui dengan membuat kurva hubungan antara \log [asam urat] terhadap E_{sel} . Batas deteksi menunjukkan batas konsentrasi analit terendah yang dapat direspon oleh biosensor. Batas deteksi dapat ditentukan dengan membuat garis singgung pada daerah kisaran konsentrasi pengukuran biosensor dan daerah di bawah kisaran konsentrasinya. Titik potong dari kedua garis singgung tersebut menunjukkan batas deteksi biosensor. Nilai batas deteksi diperoleh dari ekstrapolasi titik potong garis singgung pada sumbu x. Biosensor yang baik diharapkan memiliki kisaran konsentrasi pengukuran yang lebar. Dari kisaran konsentrasi pengukuran biosensor dapat juga diketahui batas deteksi biosensor. Batas deteksi menunjukkan batas konsentrasi terendah yang dapat direspon oleh biosensor (Eggins, 2002).

Pada Gambar 4.2. menunjukkan bahwa daerah linier potensial biosensor pada pH 9,0 berkisar pada kisaran konsentrasi 19 - 30 ppm dengan batas deteksi sebesar 19,7 ppm. Kondisi ini menandakan bahwa analisis hanya dapat dilakukan pada konsentrasi diatas 19,7 ppm. Pada konsentrasi asam urat lebih kecil dari 19,7 ppm, biosensor tidak mampu lagi merespon perubahan konsentrasi asam urat secara linier.

Waktu respon adalah waktu yang diperlukan suatu biosensor untuk memberikan respon potensial yang konstan. Hal ini disebabkan oleh terjadinya kesetimbangan reaksi yang terjadi pada elektroda. Makin cepat biosensor memberikan respon potensial yang konstan makin baik elektroda tersebut. Biosensor secara umum dapat merespon dengan cepat terhadap perubahan konsentrasi analit dalam beberapa detik dari awal merespon sampai konstan. Waktu respon ditentukan dengan cara mengukur potensial sel larutan asam urat pada kisaran konsentrasi asam urat, yaitu 1 ppm hingga 30 ppm, dengan selang waktu 30 detik selama 10 menit. Penentuan waktu respon biosensor dilakukan pada kondisi optimum yaitu pada pH 9,0. Hubungan potensial sel hasil pengukuran terhadap waktu disajikan pada Gambar 4.3. Berdasarkan gambar tersebut diketahui bahwa pada detik ke 390 setiap konsentrasi asam urat telah menunjukkan harga potensial sel yang tetap, artinya biosensor asam urat akan

mencapai harga potensial yang tetap pada 390 detik setelah biosensor dicelupkan ke dalam larutan asam urat.



Gambar 4.3. Kurva Hubungan E_{sel} terhadap waktu

Efisiensi biosensor diuji dengan mengukur potensial sejumlah larutan asam urat pada kondisi optimum yang diperoleh pada data sebelumnya, yaitu pada pH 9,0, hingga diperoleh faktor Nernst yang sesuai dengan hukum Nernst. Faktor Nernst yang tidak lagi mengikuti hukum Nernst menunjukkan bahwa biosensor sudah mengalami perubahan kemampuan untuk merespon analit. Dari hasil pengukuran diperoleh data seperti yang pada Tabel 4.3.

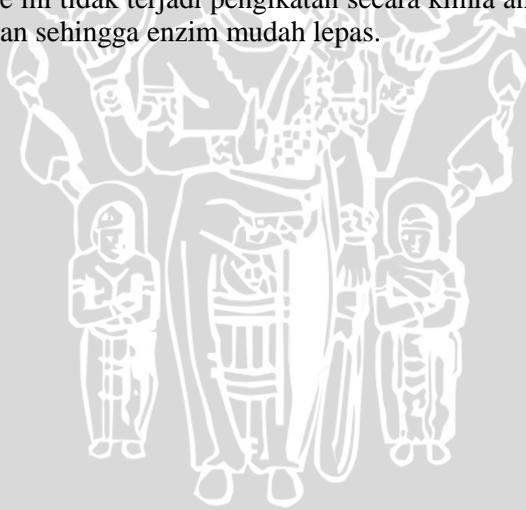
Tabel 4.3. Hubungan kali pengukuran dan Bilangan Nernst

Pengukuran ke -	Bilangan Nernst (mV/dekade)		rata-rata	% kesalahan
	I	II		
1	30,197	31,26	30,73	3,81
2	36,3	37,12	36,71	24,02

Dari Tabel 4.3 diketahui bahwa biosensor hanya bisa digunakan untuk satu kali pengukuran saja karena pada pengukuran kedua dihasilkan bilangan Nernst yang menjauhi teoritis yaitu sebesar 36,71 dengan % kesalahan sebesar 24,02%. Maka dapat disimpulkan semakin lama pengukuran yang dilakukan maka akan

menghasilkan bilangan Nernst yang semakin menjauhi nilai teoritis. Bilangan Nernst yang menjauhi nilai teoritis terlihat dari kenaikan % kesalahan yang dihasilkan. Efisiensi biosensor dipengaruhi oleh jumlah dari urikase amobil. Makin besar penurunan jumlah dari urikase amobil maka efisiensi biosensor akan makin rendah. Sebaliknya, penurunan jumlah urikase yang kecil akan menyebabkan biosensor asam urat lebih efisien. Proses amobilisasi yang baik dapat mempertahankan jumlah urikase amobil pada membran, sehingga biosensor asam urat memiliki efisiensi yang tinggi

Biosensor selama pemakaian berulang mengalami penurunan harga bilangan Nernst, Hal ini disebabkan oleh penurunan jumlah enzim yang teradsorp akibat adanya pelepasan enzim dari membran amobilisasi yang digunakan selama pemakaian. Semakin lama digunakan, jumlah enzim dalam media amobil semakin berkurang. Hal ini didukung Eggins (2002), bahwa teknik amobilisasi dengan adsorpsi ini memiliki kelemahan yaitu berkurangnya enzim secara terus menerus karena keluar dari membran amobilnya. Hal ini karena dengan metode ini tidak terjadi pengikatan secara kimia antar enzim dengan membran sehingga enzim mudah lepas.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa kinerja biosensor potensiometri asam urat dipengaruhi oleh pH. pH larutan dapat berpengaruh terhadap kisaran konsentrasi, batas deteksi, waktu respon, dan efisiensi biosensor asam urat yang dinyatakan dalam bilangan Nernst. Biosensor potensiometri asam urat dengan menggunakan membran *nata de coco* ini menunjukkan kinerja maksimum pada pH 9,0 dengan nilai bilangan Nernst sebesar 31,52 mV/dekade, kisaran konsentrasi antara 19 ppm hingga 30 ppm, batas deteksi sebesar 19,7 ppm, waktu respon sebesar 390 detik dan hanya dapat digunakan dalam satu kali pengukuran kadar asam urat dengan.

5.2. Saran

Penelitian ini masih memerlukan kajian lebih lanjut, terutama mengetahui nilai aktivitas enzim pada berbagai pH karena aktivitas enzim pada berbagai pH dapat mempengaruhi kinerja biosensor, dimana aktivitas enzim akan maksimum pada pH yang sesuai dengan kondisi optimumnya. Oleh karena itu penting dilakukan penelitian untuk mengetahui aktivitas enzim pada berbagai pH agar dapat diperoleh harga bilangan Nernst yang sesuai dengan teoritis yaitu 29,6 mV/dekade.

DAFTAR PUSTAKA

- Arslan, F., 2008, An Amperometric Biosensor for Uric Acid Determination Prepared From Urikase Immobilized in Polyaniline-Polypyrrole Film, *Sensors*, **9**,108-112
- Ayhan, F., H. Ayhan, E. Piskin, and A. Tanyolac, 2002, Optimization of Urease Immobilization onto Non-porous HEMA Incorporated Poly (EGDMA) Microbeds and Estimation of Kinetic Parameters, <http://lib.Bioinfo.pl/pmid:11762905>. tanggal akses 20 April 2011
- Cabral, J. M., 2001, **Biotransformations : Basic Biotechnology**, Cambridge University Press, United Kingdom, hal, 471-502
- Chaplin, M., 2004, **Potentiometric Biosensors**, Faculty of Engineering, Science and The Built Environment, South Bank University, London
- Eggins, B.R., 2002, **Chemical Sensors and Biosensors**, John Willey & Sons Ltd., West Sussex
- Fennema, O.R., 1996, **Food Chemistry**, 3rd ed., Marcell Dekker, Inc., New York, hal. 455, 504
- 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.dddmag.com, diakses pada tanggal 21 Maret 2011
- Jianguo, L., L. Gaoxiang, L. Hong dan Z. Xiukai, 1994, Purification and Properties Of Urikase From *Candida* sp. And Its Application In Uric Acid Analysis In Serum, *J. Micro.*, **47**, 57-63

- Karlinatasa, E. D., A. Mulyasuryani, A. Roosdiana, 2010, Pengaruh Ketebalan Membran *Nata de coco* terhadap Kinerja Biosensor Konduktometri Asam Urat, *Skripsi*, Jurusan Kimia Universitas Brawijaya, Malang
- Khaeruddin, J.M., E. Cathaputra dan H.P. Winoto, 2007, Produksi Isopropil Alkohol Murni untuk Aditif Bensin yang Ramah Lingkungan sebagai Wujud Pemanfaatan Produk Samping pada Industri Gas Alam. Laporan Penelitian, ITB, hal. 11-12
- Krisna, A. W., A. Mulyasuryan dan A. Roosdiana, 2008, Pengaruh pH Terhadap Kinerja Biosensor Asam Urat Hasil Perancangan Menggunakan Membran Kitosan, *Skripsi*, Jurusan Kimia Universitas Brawijaya, Malang
- Krystynowicz, 2001, Biosynthesis of Bacterial Cellulose and its Potential Application in the Different Industries, <http://www.biotechnology.pl.com/science/krystynomcz.htm>, tanggal akses: 17 April 2011
- Lehninger, A.L., 2004, **Principles of Biochemistry**, 4th ed., University of Wisconsin, Madison
- Liao, W.C., 2006, Study on The Uric Acid Biosensor by Potentiometric Principle, <http://www.choujc.yuntech.edu.com>, tanggal akses 20 April 2011
- 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
- Mohanty, S.P., 2001, **Biosensors: A Survey Report**, Dept. Of Comp. Science and Engineering, University of South Florida
- Murty, V.R., J. Bath dan P.K.A. Muniswaran, 2002, Hydrolysis of Oil by Using Immobilized Lipase Enzyme: A Review, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **7**, 57-66

- Ngili, Y., 2009, **Biokimia : Struktur dan Fungsi Biomolekul**, Graha Ilmu, Yogyakarta
- Nizar, A., A. Mulyasuryani dan A. Srihadyastutie, 2008, Pengaruh Jumlah Urikase Amobil pada Pembuatan Biosensor Asam Urat, *Skripsi*, Jurusan Kimia Universitas Brawijaya, Malang
- Pijanowska, D. G. and W.Torbicz, 2005, Biosensors for Bioanalytical Applications, Bulletin of The Polish Academy of Sciences, *Tech. Sci.*, **53**, 251-260
- Piluharto, B., 2003, Kajian Sifat Fisik Film Tipis *Nata de coco* Sebagai Membran Ultrafiltrasi, Universitas Jember, *Jurnal Ilmu Dasar*, **4**, 52-57
- Pisesidharta, E., Zulfikar, dan B. Kuswandi, 2009, **Preparasi Membran *Nata de coco* – Etilendiamin dan Studi Karakteristik Pengikatannya Terhadap Ion Cu^{2+}** , Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember, **2**.
- Rogers, A. and Y. Gibon, 2009, **Chapter 4: Enzyme Kinetics: Theory and Practice**, *Springer Science+Business Media, LLC*. 71-102.
- Sa'adah, B., 1996, Karakterisasi Ekstrak Kasar Enzim Urikase Hasil Isolasi *Candida utilis* , *Skripsi*, Jurusan Kimia Universitas Brawijaya, Malang
- Schrenkhammer, P., 2008, **New Optical Biosensors for Uric Acid and Glucose**, Doctoral Thesis, Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik, Universität Regensburg, Aidenbach, German
- Setiyawati, A., A. Mulyasuryan dan Sutrisno, 2008, Pembuatan dan Karakterisasi Biosensor Asam Urat Menggunakan Enzim Urikase Amobil Dalam Membran Kitosan, *Skripsi*, Jurusan Kimia Universitas Brawijaya, Malang

Suhartono, M.T., 1989, **Enzim dan Bioteknologi**, Pusat Antar Universitas Bioteknologi, IPB, Bogor

Thevenot, R. D., Toth, K., Durst, A. R., Wilson, S. G., 1999, Electrochemical Biosensors: Recommended Definition and Classification, *Pure & appl. Chem.*, **71**, 2333-2348

[Vermeeren, V.](#), 2008, Towards label-free, real-time biosensors: a nanocrystalline diamond-based sensor platform for DNA- and immunosensors, [Physiology Immunology -Biochemistry PhD theses](#), Universiteit Hasselt

Wang, J., 2001, **Analytical Electrochemistry Second Edition**, John Willey and Sons, Inc., New York

Wang, J., 2006, **Analytical Electrochemistry**, 3rd ed., John Willey and Sons, Inc., New Jersey, hal. 201-206

Zhang, F., Wang, X., 2004, Immobilization of Uricase on ZnO Nanorods for a Reagentless Uric Acid Biosensor, <http://www.inano.net>, tanggal akses 20 April 2011

Zhao, C., L.Wan, Q.Wang, S.Liu and K.Jiao, 2009, Highly Sensitive and Selective Uric Acid Biosensor Based on Direct Electron Transfer of Hemoglobin-encapsulated Chitosan-modified Glassy Carbon Electrode, *Anal. Sci.*, **25**, 1013-1017

LAMPIRAN 1

PEMBUATAN LARUTAN

L.1.1. Larutan Asam Asetat 0,2 M

Pada pembuatan larutan CH_3COOH 0,2 M dalam 100 mL larutan, yang diperlukan adalah:

$$\text{BJ } \text{CH}_3\text{COOH} = 1,05 \cdot 10^{-3} \text{ g/L}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi } \text{CH}_3\text{COOH} &= \frac{1,05 \times 10^{-3} \text{ g/L}}{60 \text{ g/mol}} \\ &= 17,5 \text{ M} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Volume } \text{CH}_3\text{COOH} &= 100 \text{ mL} \times \frac{0,2 \text{ M}}{17,5 \text{ M}} \\ &= 1,14 \text{ mL} \end{aligned}$$

Jadi, dipipet sebanyak 1,14 mL asam asetat glasial ke dalam labu takar 100 mL, selanjtnya ditambahkan dengan akuades hingga tanda batas lalu dikocok hingga homogen sehingga diperoleh larutan CH_3COOH 0,2 M.

L.1.2. Pembuatan larutan NaOH 1 M

Untuk mendapatkan larutan NaOH 1 M dalam 100 mL larutan, maka massa padatan NaOH yang perlu ditimbang adalah (Mulyono, 2006):

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

Padatan NaOH ditimbang sebanyak 4 g, kemudian dilarutkan dalam gelas kimia 100 mL dengan sedikit akuades hingga larut sempurna. Setelah dingin, larutan dipindahkan ke dalam labu takar 100 mL dan ditambahkan dengan akuades hingga tanda batas lalu dikocok hingga homogen.

L.1.3. Larutan *buffer* asetat 0,2 M pH 5

Sebanyak 100 mL larutan CH_3COOH 0,2 M dipipet ke dalam gelas kimia 250 mL lalu ditambahkan 12,69 mL larutan NaOH 1 M tetes demi tetes hingga pH larutan menjadi 5. Diukur menggunakan pH meter sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*, jika pH larutan lebih dari 5 maka larutan ditambahkan dengan larutan CH_3COOH

0,2 M dan jika pH larutan kurang dari 5 maka larutan ditambahkan dengan larutan NaOH 1 M hingga diperoleh pH larutan sebesar 5.

L.1.4. Larutan Glisin 1 M

Pada pembuatan larutan glisin 1 M sebanyak 50 mL, maka massa glisin yang harus ditimbang :

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

Sebanyak 3,75 gram glisin dimasukkan dalam gelas kimia kemudian ditambah sedikit demi sedikit aquades sambil diaduk, lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL kemudian ditambah akuades hingga tanda batas.

L.1.5. Larutan Buffer Glisin pH 8,5

Sebanyak 100 mL larutan CH_2NHCOOH 1 M dipipet dalam gelas kimia 250 mL lalu ditambahkan 4,99 mL larutan NaOH 1 M tetes demi tetes hingga pH larutan menjadi 8,5. perubahan pH diukur menggunakan pH meter sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*.

L.1.6. Reagen Biuret

Reagen biuret dengan cara pencampuran 0,15 gram CuSO_4 dan natrium tartrat 0,6 g dilarutkan dengan akuades dan diaduk hingga semua larut. Selanjutnya ditambah 30 mL NaOH 10%, lalu dituangkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas.

L.1.7. Larutan NaOH 10 %

Pada pembuatan larutan NaOH 10% sebanyak 100 mL, ditimbang sebanyak 1 gram padatan NaOH lalu dilarutkan ke dalam beaker glass selanjutnya dituangkan ke dalam labu ukur 100 mL, selanjutnya ditambah akuades hingga tanda batas.

L.1.8. Larutan Induk Kasein 10000 ppm

$$\begin{aligned}[\text{kasein}] &= 10000 \text{ ppm} \\ &= \frac{10000 \text{ mg}}{1\text{L}} = \frac{10000}{1000 \text{ mL}}\end{aligned}$$

Untuk larutan kasein 10000 ppm sebanyak 100 mL :

$$\begin{aligned}
 \text{Massa kasein} &= \frac{10000}{1000 \text{ mL}} \times 100 \text{ mL} \\
 &= 1000 \text{ mg} \\
 &= 1,0 \text{ g}
 \end{aligned}$$

Larutan induk kasein 1000 ppm dibuat dengan cara ditimbang kasein sebanyak 1 g, kemudian dilarutkan dengan 50 mL aquades dalam gelas kimia. Kemudian dimasukkan dalam labu takar 100 mL dan diencerkan dengan aquades hingga tanda batas.

L.1.9. Pembuatan larutan kasein 100 ppm

Untuk membuat larutan asam urat 1000 ppm sebanyak 25 mL, maka volume larutan kasein 10000 ppm yang dipipet adalah:

$$\begin{aligned}
 V_{\text{kasein 10000 ppm}} &= \frac{1000 \text{ ppm}}{10000 \text{ ppm}} \times 25 \text{ mL} \\
 &= 2,5 \text{ mL}
 \end{aligned}$$

Dipipet larutan asam urat 10000 ppm sebanyak 2,5 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, lalu ditandabatkan dengan akuades dan dikocok hingga homogen.

Tabel L.1.1. Komposisi Volume pada Pengenceran Larutan Kasein 10000 ppm

[Kasein] yang dibuat (ppm)	V_{kasein} yang dibuat (mL)	$V_{\text{kasein 1000 ppm}}$ yang dipipet (mL)
2000	25	5,0
3000	25	7,5
4000	25	10,0
5000	25	12,5
6000	25	15,0
7000	25	17,5
8000	25	20,0
9000	25	22,5

L.1.10. Pembuatan larutan H_3PO_4 0,1 M

$$\rho \text{ H}_3\text{PO}_4 = 1,685 \cdot 10^3 \text{ g/L}$$

$$\begin{aligned}
 [\text{H}_3\text{PO}_4] &= \frac{1,685 \cdot 10^3 \text{ g/L}}{97,97 \text{ g/mol}} \\
 &= 17,1939 \text{ M}
 \end{aligned}$$

Untuk larutan H_3PO_4 0,1 M sebanyak 500 mL :

$$\begin{aligned} \text{Volume H}_3\text{PO}_4 &= \frac{0,1 \text{ M} \times 500\text{mL}}{17,1939 \text{ M}} \\ &= 2,9 \text{ mL} \end{aligned}$$

L.1.11. Pembuatan *Buffer* Fosfat

Buffer Fosfat terdiri dari campuran larutan asam fosfat (H_3PO_4) 0,1 M dan natrium hidroksida (NaOH) 0,1 M. Asam Fosfat memiliki tetapan disosiasi asam : $\text{pK}_{a1} = 2,15$; $\text{pK}_{a2} = 7,21$; $\text{pK}_{a3} = 12,35$ Perhitungan komposisi campuran *Buffer* dihitung berdasarkan persamaan berikut :

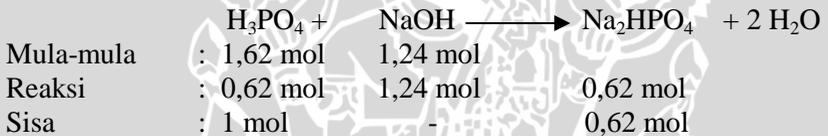
$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \left(\frac{[\text{basa konjugat}]}{[\text{asam}]} \right)$$

Contoh perhitungan untuk pH 7 :

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \left(\frac{[\text{basa konjugat}]}{[\text{asam}]} \right)$$

$$\begin{aligned} \log \left(\frac{[\text{basa konjugat}]}{[\text{asam}]} \right) &= \text{pH} - \text{pK}_{a1} \\ &= 7 - 7,21 \\ &= -0,21 \end{aligned}$$

$$\frac{[\text{basa konjugat}]}{[\text{asam}]} = 0,62$$



Jika $[\text{H}_3\text{PO}_4] = 0,1 \text{ M}$; $[\text{NaOH}] = 0,1 \text{ M}$ dan volume total campuran 100 mL, maka volume yang dicampurkan adalah $\text{H}_3\text{PO}_4 = 56,6 \text{ mL}$ dan $\text{NaOH} = 43,4 \text{ mL}$. Cara yang sama dapat diketahui komposisi penampuran $\text{H}_3\text{PO}_4 = 0,1 \text{ M}$ dan $\text{NaOH} = 0,1 \text{ M}$ untuk memperoleh pH 7; 7,5; 8; 8,5; 9; 9,5; 10 yang dapat dilihat pada tabel L.2.2 berikut

Tabel L.1.2. Komposisi Volume H_3PO_4 dan NaOH :

pH	Volume H_3PO_4 (mL)	Volume NaOH (mL)
7	56,6	43,4
7,5	43,1	56,9
8	36,8	63,2
8,5	34,5	65,5
9	33,7	66,3
9,5	32,6	67,4

L.1.12. Pembuatan larutan asam urat berbagai konsentrasi

L.1.12.1. Pembuatan larutan asam urat 250 ppm

Untuk membuat larutan asam urat 250 ppm, maka massa padatan asam urat yang ditimbang adalah:

$$\begin{aligned}\text{Massa asam urat} &= 250 \text{ mg/L} \times 0,5 \text{ L} \\ &= 125 \text{ mg} \\ &= 0,125 \text{ g}\end{aligned}$$

Sebanyak 0,125 g asam urat ditimbang dan dimasukkan dalam gelas kimia 250 mL, ditambahkan sebanyak 0,125 mg NaOH dan dilarutkan dengan sedikit air hingga larut seluruhnya. Kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 500 mL, ditandabatkan dengan akuades dan dikocok hingga homogen. Setelah larutan asam urat diperoleh, maka larutan disimpan dalam lemari pendingin

L.1.12.2. Pembuatan Larutan Asam Urat 1-35 ppm Berbagai pH Contoh :

*Untuk larutan asam urat 1 ppm :

Volume larutan asam urat induk 250 ppm yang harus diambil adalah

$$\begin{aligned}\text{Volume} &= \frac{1 \text{ ppm} \times 50 \text{ mL}}{250 \text{ ppm}} \\ &= 0,2 \text{ mL}\end{aligned}$$

Tabel L.1.3. Komposisi Volume Asam Urat untuk Pengenceran

[asam urat] (ppm)	Volume asam urat 250 ppm (mL)	Volume akhir (mL)
1	0,2	50
5	1	50
10	2	50
15	3	50
20	4	50
25	5	50
30	6	50
35	7	50

Larutan asam urat dengan berbagai konsentrasi 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 dan 35 ppm dibuat dari larutan asam urat 250 ppm dengan volume tertentu dan dimasukkan labu takar 50 mL kemudian diencerkan dengan larutan buffer fosfat yang sesuai.

L.1.13. Pembuatan Larutan NaHCO₃ Induk 100 ppm

$$\begin{aligned}[\text{NaHCO}_3] &= 100 \text{ ppm} \\ &= \frac{100\text{mg}}{1\text{L}} = \frac{100 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}}\end{aligned}$$

Untuk larutan NaHCO₃ 100 ppm sebanyak 100 mL :

$$\begin{aligned}\text{Massa NaHCO}_3 &= \frac{100\text{mg}}{1000 \text{ mL}} \times 100 \text{ mL} \\ &= 10 \text{ mg} = 0,01 \text{ g}\end{aligned}$$

NaHCO₃ ditimbang sebanyak 0,01 g dan dilarutkan dalam akuades, kemudian larutan dipindah ke dalam labu takar 100 mL, ditambah akuades hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen.

L.1.14. Pembuatan Larutan NaHCO₃ 1-30 ppm

L.1.14.2. Pembuatan larutan NaHCO₃ 1 ppm

Untuk membuat larutan NaHCO₃ 1 ppm sebanyak 50 mL, maka volume larutan NaHCO₃ 50 ppm yang harus dipipet adalah:

$$V_{\text{NaHCO}_3 \text{ 100 ppm}} = \frac{1 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} \times 50 \text{ mL} = 0,5 \text{ mL}$$

Dipipet sebanyak 1 mL larutan NaHCO₃ 50 ppm lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL, ditanda bataskan dengan akuades dan dikocok hingga homogen.

Tabel L.1.4. Komposisi Volume pada Pengenceran Larutan NaHCO₃ 100 ppm:

[NaHCO ₃] yang dibuat (ppm)	Vol. NaHCO ₃ yang dibuat (mL)	Vol. NaHCO ₃ 50ppm yang dipipet (mL)
1	50	0,5
5	50	2,5
10	50	10,5
15	50	7,5
17	50	8,5
19	50	9,5
21	50	10,5
23	50	11,5
25	50	12,5
30	50	15

LAMPIRAN 2

ISOLASI ENZIM URIKASE DARI *Candida utilis* DAN PEMBUATAN MEMBRAN NATA *DE COCO*

L.2.1. Penyiapan media pembiakan *Candida utilis*

Pada pembuatan media pembiakan ini dilakukan pada dua media yang berbeda, yakni media padat dan media cair (Krisna, 2008 dan Karlinatasa, 2010).

L.2.1.1. Pembuatan media padat

Pembuatan media padat dilakukan dengan menimbang 1,5 g ekstrak yeast; 0,5 g asam urat; 12,5 g glukosa, 7 g KH_2PO_4 ; 5 g NH_4Cl ; 1,08 g Na_2HPO_4 ; 1,78 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,008 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,008 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; dan 15 g agar. Bahan-bahan tersebut dimasukkan ke dalam gelas kimia dan dilarutkan dengan 1000 mL akuades, diaduk hingga larut. Kemudian diukur pH larutan dan ditambahkan asam asetat 0,2 M hingga pH menjadi 5 serta ditambahkan 10 mL larutan *buffer* asetat pH 5. Larutan tersebut dididihkan hingga jernih lalu dimasukkan sebanyak 5 mL larutan ke dalam tabung reaksi dan ditutup dengan kapas steril. Selanjutnya tabung reaksi disterilkan menggunakan *autoclave* selama 3 jam pada tekanan 15 psi. Setelah disterilisasi, tabung reaksi diletakkan dalam posisi miring untuk memperluas media pertumbuhan kultur (Krisna, 2008 dan Karlinatasa, 2010).

L.2.1.2. Pembuatan media cair

Pada pembuatan media cair ini dibuat dari bahan-bahan yang sama dengan bahan pada pembuatan media padat, tetapi tanpa penambahan agar. Bahan-bahan tersebut dimasukkan ke dalam gelas kimia dan dilarutkan dengan 1000 mL akuades, diaduk hingga larut. Kemudian diukur pH larutan dan ditambahkan asam asetat 0,2 M hingga pH menjadi 5 serta ditambahkan 10 mL larutan *buffer* asetat pH 5. Larutan tersebut dididihkan hingga jernih dan larut seluruhnya lalu dimasukkan sebanyak 100 mL larutan ke dalam erlenmeyer dan ditutup dengan kapas steril. Selanjutnya tabung reaksi disterilkan menggunakan *autoclave* selama 3 jam pada tekanan 15 psi. Setelah

disterilkan, erlenmeyer didinginkan (Krisna, 2008 dan Karlinatasa, 2010).

L.2.2. Peremajaan kultur murni *Candida utilis*

Kapang *Candida utilis* dari biakan murni diambil sebanyak satu otse dan dipindahkan ke dalam media padat steril. Mulut tabung reaksi disterilkan dengan bunsen selama proses pemindahan, kemudian diinkubasi selama 4 hari pada temperatur 30 °C dalam inkubator (Krisna, 2008 dan Karlinatasa, 2010).

L.2.3. Produksi enzim urikase

Akuades steril dipipet sebanyak 10 mL dan dimasukkan ke dalam 1 tabung biakan murni *Candida utilis* kemudian dikocok. Inokulum yang terbentuk dituang ke dalam media cair steril, kemudian ditempatkan dalam *shaker* pada temperatur kamar lalu diinkubasi selama 26 jam (Krisna, 2008 dan Karlinatasa, 2010).

L.2.4. Isolasi enzim urikase

Media cair hasil peremajaan kultur murni disentrifugasi dingin pada kecepatan 3000 rpm dan suhu 4°C selama 20 menit. Endapan yang terbentuk ditambah dengan larutan *buffer* glisin pH 8,5 hingga diperoleh konsentrasi 100 mg/mL, kemudian pengeluaran enzim dilakukan dengan penggerusan menggunakan serpihan kaca lalu disentrifugasi dingin selama 20 menit. Supernatan yang merupakan ekstrak enzim disimpan dalam botol gelap steril pada temperatur 5°C (Krisna, 2008 dan Karlinatasa, 2010).

L.2.5. Penentuan kadar protein

L.2.5.1. Penentuan panjang gelombang maksimum kasein

Dipipet sebanyak 2 mL larutan kasein 5000 ppm ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambah 8 mL pereaksi biuret dan 2 mL *buffer* glisin pH 8,5. Campuran dikocok dan didiamkan selama 30 menit pada temperatur kamar. Sebagai blanko, dipipet sebanyak 2 mL akuades ditambah dengan 8 mL pereaksi biuret dan 2 mL *buffer* glisin pH 8,5, dikocok dan didiamkan selama 30 menit pada temperatur kamar. Larutan kasein 5000 ppm dan blanko diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada kisaran panjang gelombang 200 hingga 400 nm. Panjang gelombang

maksimum diperoleh pada saat serapan larutan kasein maksimum (Krisna, 2008 dan Karlinatasa, 2010).

L.2.5.2. Pembuatan kurva baku kasein

Masing-masing larutan kasein konsentrasi 1000 hingga 10000 ppm dipipet sebanyak 2 mL ke dalam tabung reaksi, ditambah 8 mL pereaksi biuret dan 2 mL larutan *buffer* glisin pH 8,5. Campuran dikocok dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Kemudian diukur absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum dan dilakukan duplo. Selanjutnya dibuat kurva linier yang menunjukkan hubungan antara absorbansi (sumbu Y) dan konsentrasi kasein (sumbu X) (Krisna, 2008 dan Karlinatasa, 2010).

L.2.5.3. Penentuan kadar protein urikase hasil isolasi

Urikase hasil isolasi dipipet sebanyak 2 mL, ditambah 8 mL pereaksi biuret dan 2 mL larutan *buffer* glisin pH 8,5. Campuran dikocok dan dibiarkan selama 30 menit pada suhu kamar, kemudian diukur absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-vis pada panjang gelombang maksimum dan dilakukan duplo. Hasil pengukuran diekstrapolasikan terhadap kurva baku kasein sehingga diperoleh nilai konsentrasi protein (Krisna, 2008 dan Karlinatasa, 2010).

L.2.5.4. Penentuan kadar protein urikase yang teramobilkan

Sebanyak 2 mL supernatan enzim urikase sisa amobilisasi dipipet dan ditambah 8 mL pereaksi biuret dan 2 mL larutan *buffer* glisin pH 8,5. Campuran dikocok dan dibiarkan selama 30 menit pada suhu kamar, kemudian diukur absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-vis pada panjang gelombang maksimum dan dilakukan duplo. Hasil pengukuran diekstrapolasikan terhadap kurva baku kasein sehingga diperoleh nilai konsentrasi protein. Kadar protein urikase yang teramobilkan diperoleh dari selisih antara kadar protein urikase hasil isolasi dengan kadar protein urikase sisa amobilisasi (Krisna, 2008 dan Karlinatasa, 2010).

L.2.6. Pembuatan membran *nata de coco*

Nata de coco dibuat dengan mendidihkan 1000 mL air kelapa, ditambahkan dengan 10 g sukrosa, 5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dan 1 g MgSO_4 , lalu didinginkan. Setelah dingin, larutan air kelapa ditambah dengan asam asetat pekat hingga pH 4 dan starter sebanyak 100 mL, dituangkan ke dalam cetakan, ditutup rapat menggunakan kertas koran dan dibiarkan selama 3-4 hari. Hasil membran *nata de coco* dinetralkan menggunakan larutan NaOH dengan merendam membran seluruhnya sampai pH netral (Pisesidharta, dkk.,2009)



LAMPIRAN 3

PENENTUAN KADAR PROTEIN ENZIM

L.3.1. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum (λ_{maks}) Kasein

[Kasein] = 5000 ppm

λ_{maks} = 543,0 nm

Absorbansi = 0,1508

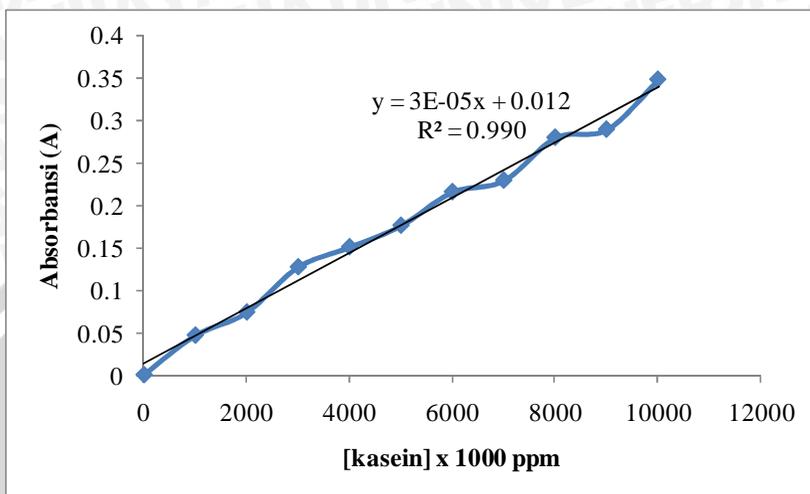
Tabel L.3.1. Data Absorbansi Kasein Berbagai Panjang Gelombang

λ (nm)	Abs (A)	λ (nm)	Abs (A)	λ (nm)	Abs (A)	λ (nm)	Abs (A)
200	0.2047	310	0.9136	410	0.0825	510	0.1334
210	0.0856	320	0.6224	420	0.0730	520	0.1427
220	0.1271	330	0.4810	430	0.0681	530	0.1487
230	0.0029	340	0.3743	440	0.0675	540	0.1508
240	0.0470	350	0.2921	450	0.0708	550	0.1498
250	0.0077	360	0.2292	460	0.0773	560	0.1459
260	0.0916	370	0.1812	470	0.0863	570	0.1396
270	0.0708	380	0.1450	480	0.0972	580	0.1316
280	0.1127	390	0.1174	490	0.1094	590	0.1221
290	0.9889	400	0.0970	500	0.1221	600	0.1111
300	1.3359						

L.3.2. Pembuatan Kurva Baku Kasein

Tabel L.3.2. Absorbansi Kasein pada 543,0 nm

[Kasein] ppm	Absorbansi (A)
0	0
1000	0.0466
2000	0.0737
3000	0.127
4000	0.1506
5000	0.1759
6000	0.2155
7000	0.2291
8000	0.2795
9000	0.2891
10000	0.3478



Gambar L.3.1, Kurva Baku hubungan antara konsentrasi Kasein (ppm) dan Absorbansi (A)

L.3.3. Penentuan Kadar Protein

Kadar protein urikase ditentukan dengan mengkonversikan absorbansi larutan pada persamaan kurva baku kasein.

Persamaan regresi kasein : $y = 0,00003x$

Absorbansi enzim urikase hasil isolasi : 0,0918 (y), maka

$$y = 3 \cdot 10^{-5} x$$

$$0,0918 = 3 \cdot 10^{-5} x$$

$$x = 3060 \text{ ppm} = 3,06 \text{ mg/mL}$$

Kadar protein enzim urikase hasil isolasi :

$$= x \cdot \text{faktor pengenceran}$$

$$= 3,06 \text{ mg/mL} \cdot \frac{10 \text{ mL}}{1 \text{ mL}}$$

$$= 30,6 \text{ mg/ml}$$

L.3.4. Penentuan Jumlah Urikase yang Teramobilkan

Absorbansi enzim setelah amobilisasi : 0,0822 (y), maka :

$$y = 3 \cdot 10^{-5} x$$

$$0,0822 = 3 \cdot 10^{-5} x$$

$$x = 2740 \text{ ppm} = 2,74 \text{ mg/mL}$$

Kadar protein enzim urikase sisa amobilisasi :

$$= x \cdot \text{faktor pengenceran}$$

$$= 2,74 \text{ mg/mL} \cdot \frac{10\text{mL}}{1\text{mL}}$$

$$= 27,4 \text{ mg/mL}$$

Dalam amobilisasi digunakan 18 mL enzim, sehingga :

$$\text{Cenzim yang teramobilkan} = (\text{Cenzim awal} - \text{Cenzim setelah amobilisasi}) \times 18 \text{ mL}$$

$$= (30,6 \text{ mg/mL} - 27,4 \text{ mg/mL}) \times 18 \text{ mL}$$

$$= 57,6 \text{ mg}$$

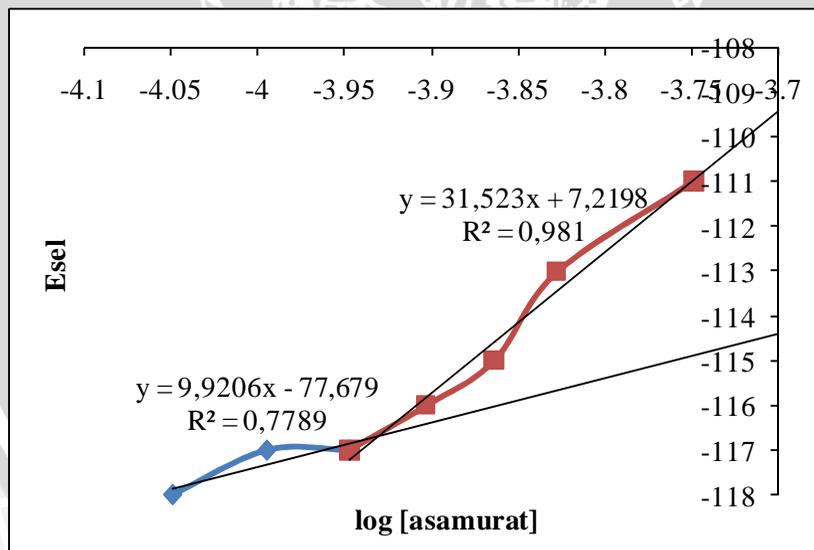


LAMPIRAN 4

PENENTUAN BILANGAN NERNST, BATAS DETEKSI DAN KISARAN KONSENTRASI

Tabel 4.1.1 Data Potensial Sel E_{sel} pada Konsentrasi Asam Urat 15-30 ppm

[asam urat] (ppm)	[asam urat]	log [asam urat]	E_{sel} (mV)
15	8,92E-05	-4,050	-118
17	1,01E-04	-3,995	-117
19	1,13E-04	-3,947	-117
21	1,25E-04	-3,903	-116
23	1,37E-04	-3,864	-115
25	1,49E-04	-3,828	-113
30	1,78E-04	-3,749	-111



Gambar L.4.1. Kurva Hubungan log [asam urat] dengan E_{sel} pada Konsentrasi Asam Urat 15-30 ppm

Pada Gambar L.4.1.diperoleh persamaan $y = 31,52x + 7,219$ maka bilangan Nernstnya adalah 31,52 mV/dekade

Berdasarkan data di atas maka kisaran konsentrasi adalah sebesar 19 hingga 30 ppm

Batas bawah ditentukan dengan perhitungan sebagai berikut :

$$9,9206x - 77,679 = 31,52x + 7,2198$$

$$(9,9206 - 31,52) x = 7,2198 + 77,679$$

$$-21,602 x = 84,8988$$

$$x = -$$

$$\log [\text{asam urat}] = -3,93$$

$$[\text{asam urat}] = 1,17 \cdot 10^{-4} \text{ M}$$

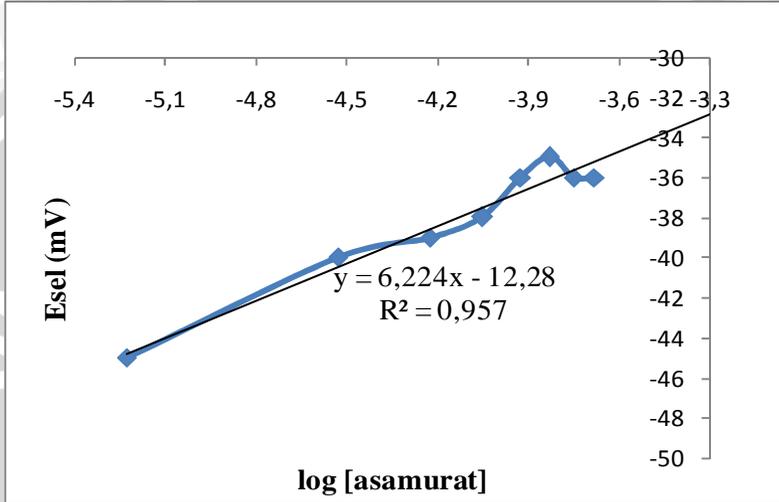
$$[\text{asam urat}] = 1,17 \cdot 10^{-4} \times 168,122 \times 1000$$

$$= 19,7 \text{ ppm}$$

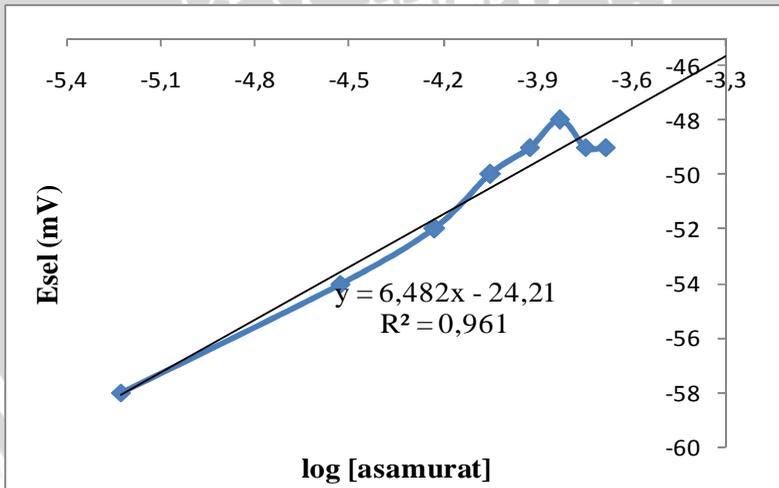


LAMPIRAN 5

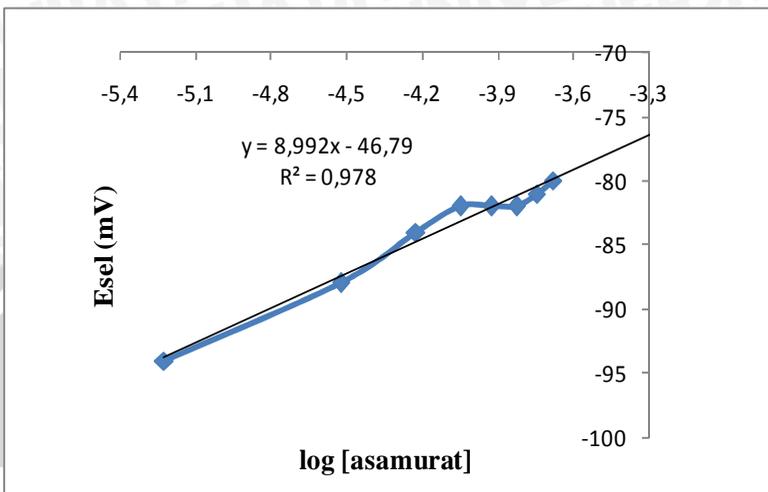
PENENTUAN BILANGAN NERNST PADA BERBAGAI MACAM pH



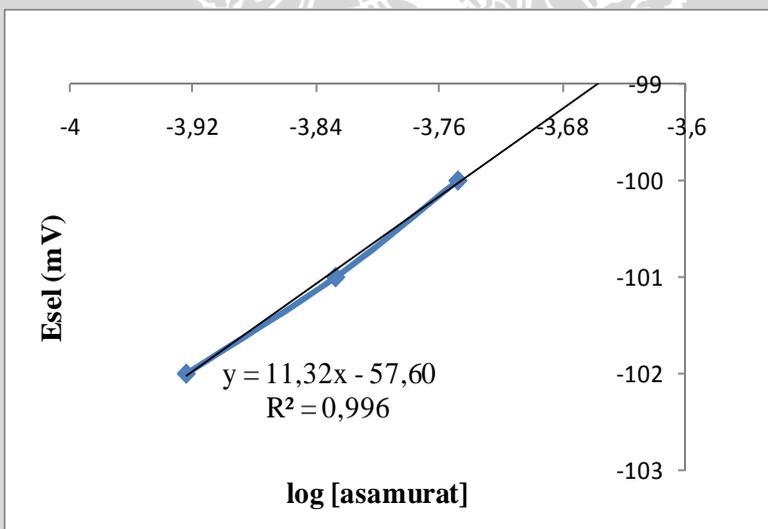
Gambar 5.1. Kurva hubungan [asam urat] dengan E_{sel} pada konsentrasi 1-35 ppm pH 7,0



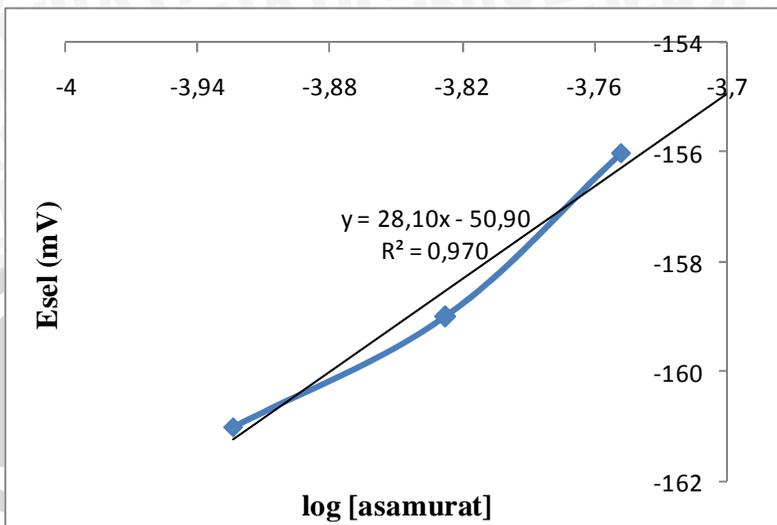
Gambar 5.2. Kurva hubungan [asam urat] dengan E_{sel} pada konsentrasi 1-35 ppm pH 7,5



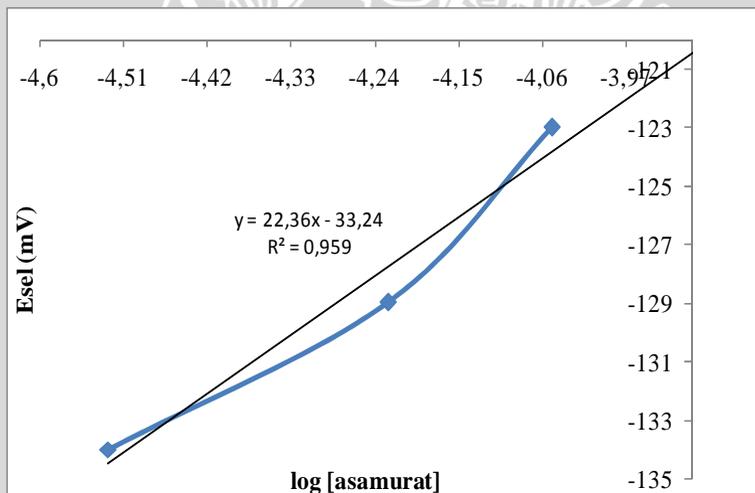
Gambar 5.3. Kurva hubungan [asam urat] dengan E_{sel} pada konsentrasi 1-35 ppm pH 8,0



Gambar 5.4. Kurva hubungan [asam urat] dengan E_{sel} pada konsentrasi 20-30 ppm pH 8,5



Gambar 5.5. Kurva hubungan [asam urat] dengan E_{sel} pada konsentrasi 20-30 ppm pH 9,0



Gambar 5.6. Kurva hubungan [asam urat] dengan E_{sel} pada konsentrasi 5-15 ppm pH 9,5

LAMPIRAN 6. DATA HASIL PENGUKURAN

Tabel 6.1. Data Hasil Pengukuran potensial sel pada pH 7,0 – 8,0

[asam urat] (ppm)	E _{sel} (mV)											
	pH 7,0				pH 7,5				pH 8,0			
	I	II	III	rata-rata	I	II	III	rata-rata	I	II	III	rata-rata
0	-66	-74	-79	-73	-81	-73	-72	-75,333	-120	-97	-106	-107,667
1	-45	-53	-50	-49,333	-64	-58	-65	-62,333	-94	-87	-87	-89,333
5	-40	-49	-44	-44,333	-60	-54	-61	-58,333	-88	-85	-83	-85,333
10	-39	-47	-41	-42,333	-59	-52	-59	-56,667	-84	-84	-80	-82,667
15	-38	-44	-39	-40,333	-56	-50	-56	-54	-82	-83	-79	-81,333
20	-36	-44	-37	-39	-55	-49	-55	-53	-82	-83	-79	-81,333
25	-35	-43	-37	-38,333	-54	-48	-56	-52,667	-82	-82	-78	-80,667
30	-36	-43	-37	-38,667	-54	-49	-54	-52,333	-81	-82	-78	-80,333
35	-36	-42	-37	-38,333	-53	-49	-53	-51,667	-80	-82	-78	-80

Tabel 6.2. Data Hasil Pengukuran potensial sel pada pH 8,5 - 9,5

[asam urat] (ppm)	Esel (mV)											
	pH 8,5				pH 9,0				pH 9,5			
	I	II	III	rata-rata	I	II	III	rata-rata	I	II	III	rata-rata
0	-116	-108	-114	-112,67	-163	-151	-160	-158	-126	-120	-131	-125,67
1	-102	-105	-105	-104	-165	-158	-157	-160	-120	-120	-125	-121,67
5	-101	-102	-103	-102	-166	-160	-159	-161,67	-130	-128	-134	-130,67
10	-101	-102	-102	-101,67	-166	-156	-157	-159,67	-124	-120	-129	-124,33
15	-102	-100	-102	-101,33	-159	-154	-153	-155,33	-119	-116	-123	-119,33
20	-102	-101	-101	-101,33	-161	-152	-152	-155	-124	-120	-129	-124,33
25	-101	-101	-101	-101	-159	-152	-152	-154,33	-114	-111	-120	-115
30	-100	-98	-100	-99,333	-156	-149	-149	-151,33	-116	-109	-120	-115
35	-98	-96	-100	-98	-157	-150	-148	-151,67	-118	-110	-124	-117,33

Tabel 6.3. Data Hasil Pengukuran Waktu Respon

waktu respon (detik)	E_{sel} (mV)								
	0 ppm	10 ppm	15 ppm	17 ppm	19 ppm	21 ppm	23 ppm	25 ppm	30 ppm
30	-120	-117	-119	-126	-118	-117	-116	-115	-112
60	-119	-116	-119	-126	-118	-117	-116	-114	-112
90	-118	-116	-119	-125	-118	-117	-116	-114	-112
120	-118	-115	-118	-125	-118	-117	-116	-114	-112
150	-117	-115	-118	-125	-118	-117	-116	-114	-112
180	-118	-115	-118	-125	-118	-117	-116	-114	-112
210	-118	-115	-117	-125	-117	-116	-116	-114	-111
240	-117	-115	-118	-125	-117	-116	-116	-114	-111
270	-117	-115	-118	-125	-117	-116	-116	-114	-111
300	-117	-115	-118	-125	-117	-116	-116	-114	-111
330	-117	-114	-118	-125	-117	-116	-116	-114	-111
360	-117	-114	-118	-125	-117	-116	-116	-114	-111
390	-117	-114	-118	-125	-117	-116	-115	-113	-111
420	-117	-114	-118	-125	-117	-116	-115	-113	-111
450	-116	-114	-118	-125	-117	-116	-115	-113	-111
480	-116	-114	-118	-124	-117	-116	-115	-113	-111
510	-116	-114	-117	-124	-117	-116	-115	-113	-111
540	-116	-114	-117	-124	-117	-116	-115	-113	-111
570	-116	-114	-117	-124	-117	-116	-115	-113	-111
600	-116	-114	-117	-124	-117	-116	-115	-113	-111

Tabel 6.4. Data Hasil Pengukuran Dua Kali Pengulangan Lama Pemakaian

[asam urat] (ppm)	log [asam urat]	E _{sel} (mV)	
		I	II
19	-3,95	-120	-120
21	-3,90	-119	-119
23	-3,86	-117	-118
25	-3,83	-116	-116
30	-3,75	-114	-113
Bilangan nernst (mV/dekade)		31,26	36,3

[asam urat] (ppm)	log [asam urat]	E _{sel} (mV)	
		I	II
19	-3,95	-117	-117
21	-3,90	-116	-116
23	-3,86	-116	-113
25	-3,83	-115	-112
30	-3,75	-114	-110
Bilangan nernst (mV/dekade)		30,197	37,12

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

